

Aus der Klinik für Visceral-, Thorax-, und Gefäßchirurgie

Direktor: Prof. Dr. med. Detlef K. Bartsch

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen und
Marburg GmbH, Standort Marburg

Überlebensstudie am transgenen Tumormausmodell
des Pankreaskarzinoms bei Chemotherapie mit
Gemcitabine und additiver Aspirinapplikation.

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
gesamten Humanmedizin

Dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg,
vorgelegt von:

Lars Christian Pläßmeier aus Heidelberg
Marburg, 2021

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
25.3.2021

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Denise Hilfiker-Kleiner

Referent: Prof. Dr. med. Volker Fendrich

1. Korreferent: Prof. Dr. med. Andreas Neubauer

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Das Pankreaskarzinom	1
1.2 Molekulare Ursachen des Pankreaskarzinoms	3
1.2.1 Das K-ras Onkogen	4
1.2.1.1 Die Rolle von K-ras in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms	6
1.2.2 Das Tumorsuppressorgen p53	6
1.2.2.1 Das Tumorsuppressorgen p53 im Pankreaskarzinom	7
1.3 Molekulare Signalwege im Pankreaskarzinom	7
1.3.1 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	8
1.3.2 PI3K/Akt-Signalwege	9
1.4 Cyclooxygenasen	11
1.4.1 Die Cyclooxygenase-2-Expression beim Pankreaskarzinom	12
1.4.2 Acetylsalicylsäure	13
1.5 Gemcitabine	15
1.6 Das Pankreaskarzinom im Tumormausmodell	16
1.7 Zielsetzung	20
1.8 Fragestellung	21
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Mauslinie	22
2.1.2 Geräte und Zubehör	22
2.1.3 Gebrauchswaren	23
2.1.4 Chemikalien	24
2.1.5 Enzyme und Nukleotide	25
2.1.6 Puffer und Stammlösungen	25
2.1.6.1 Puffer	25
2.1.6.2 Stammlösungen	25
2.1.7 Antikörper	26
2.1.7.1 Primäre Antikörper	26
2.1.7.2 Sekundäre Antikörper	27
2.1.7.3 Sekundäre Konjugate	27
2.1.8 Primer	27
2.1.9 Gebrauchsfertige Systeme	27
2.1.10 Sterilisation von Materialien	28
2.1.11 Software	28
2.2 Methoden	28
2.2.1 Genotypisierung der Mäuse	28
2.2.1.1 DNA-Extraktion aus einer Mäuseschwanzbiopsie	28
2.2.1.2 Standard-PCR	29
2.2.1.3 Durchführung der PCR	30
2.2.1.4 Herstellung eines Agarosegels	31
2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese und Auswertung der PCR	32

2.2.2	Haltung und Zucht der Tiere	33
2.2.3	Versuchsplan und Ablauf der intraperitonealen Injektionen	34
2.2.4	Tötungszeitpunkte der Gruppen und Entnahme der Organe	34
2.2.5	Histologische Untersuchung des Gewebes	35
2.2.6	Färbungen	35
2.2.6.1	Hämalaun-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten	35
2.2.6.2	Immunhistochemische Färbungen	35
2.2.6.2.1	Indirekte Methode	36
2.2.6.2.2	Prozess der immunhistochemischen Färbung	36
2.2.7	Statistik	37
3.	Ergebnisse	38
3.3.1	Auswirkung der Pdx1 Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} Mutationen auf das Pankreas	38
3.1.2	Auswertung von Drop-outs in den Therapiegruppen	39
3.2	Effekt der Gemcitabine und Gemcitabine + ASS Therapie auf das Überleben der Pdx-1-Cre-LSL-Kras ^{G12D/+} -LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäuse	40
3.3.1	Überexpression von NF-κB in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäusen	41
3.3.2	Überexpression der Amylase in PanINs und Pankreaskarzinom in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäuse	42
3.3.3	Überexpression von Snail in PanINs und Pankreaskarzinom in Pdx-1-Cre;LSL-Kras ^{G12D/+} ;LSL-Trp53 ^{R172H/+} -Mäusen	43
4.	Diskussion	46
5.	Quellenverzeichnis	49
6.	Anhang	59
6.1	Akademische Lehrer	59
6.2	Danksagung	60
6.3	Ehrenwörtliche Erklärung	61

I Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Jährlich erkranken beinahe 14000 Menschen in Deutschland am dukalen Adenokarzinom des Pankreas, dies entspricht ungefähr 3 Prozent der Krebserkrankungen in Deutschland und ist damit die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und die fünfhäufigste bei Frauen weltweit [2].

Die bisher einzige kurative Möglichkeit ist die chirurgische R0-Resektion. Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 2 Prozent [64]. Da das Pankreaskarzinom eine überaus schlechte Prognose hat und die aktuell zur Verfügung stehenden Therapieoptionen durch verschiedene Chemotherapien zwar signifikante Überlebensverlängerungen erzielen, diese aber keineswegs zufriedenstellend sind, ist die Erforschung neuer Therapieansätze von größter Wichtigkeit [28].

Hierzu wurde von der Arbeitsgruppe um Dave Tuveson ein transgenes Tumormausmodell des Pankreaskarzinoms entwickelt, welches die Karzinogenese, das Tumorwachstum und die Metastasierung in einer mit dem Menschen vergleichbaren Tumorgenese nachbildet [40]. Hierdurch ist eine in vivo Untersuchung neuer Therapien möglich.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits ein vielversprechender Ansatz mit Enalapril und Aspirin als Chemoprävention des Pankreaskarzinoms etabliert [27]. Dieser Therapieansatz führte zu einer deutlichen Verlangsamung und partiellen Suppression des Tumorwachstums.

In der folgenden Arbeit wurde der Effekt einer additiven Aspirintherapie zur Gemcitabine-Standardchemotherapie auf das Überleben der Pdx-1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse in einem Tumorthherapieansatz untersucht.

Es zeigte sich, dass Aspirin das Überleben der Tiere gegenüber der Gemcitabinemonotherapie nicht verlängert (200 vs. 190; $p=0,09$). Eine Auswirkung auf die Expression von relevanten Zielproteinen wie NF- κ B konnte im Vergleich zum präventiven Ansatz nicht nachgewiesen werden.

Daher bleibt die Aspirintherapie eine in der Prophylaxe im Tiermodell erfolgreich angewandte Option, welche in der Tumorthherapie keine signifikanten Effekte erzielen konnte. Ob eine derartige Therapie im prophylaktischen Setting auch beim Menschen sinnvoll ist bleibt weiterhin unklar.

II Abstract

Pancreatic cancer is a highly malignant disease with a poor prognosis. Every year almost 14.000 people in Germany fall ill with a ductal adenocarcinoma of the pancreas, which is about 3 percent of the total cancer diseases in Germany, and on the fourth position of cancer diseases in men and on the fifth position of cancer diseases in women [2].

So far, the only chance for healing is the surgical R0-resection. In total, the 5-year survival rate is less than 2 percent [64]. Since pancreatic cancer has an extremely poor prognosis and the therapeutic options of chemotherapy which are available are significantly prolonging survival but are still little promising. Therefor the development of new therapy approaches is highly relevant [28].

In 2003 the research group of Dave Tuveson developed a transgenic mouse model of pancreatic cancer, which simulates the carcinogenesis, the cancer increase and way of metastasis similar to human beings [40]. Hereby a research of new therapies in vivo has become possible.

In our research group a very promising approach with enalapril and aspirin as chemoprevention of pancreatic cancer was established and lead to a significant slowdown and partial suppression of cancer increase [27].

In this thesis the effect of an additive aspirin therapy to the standard gemcitabine chemotherapy on the survival of the Pdx-1-Cre; LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}-mice was analyzed in a cancer therapy approach.

Aspirin did not prolonged the survival (200 vs. 190 days; $p=0,09$) in comparison to gemcitabine chemotherapy. An impact on the expression of relevant target proteins like NF- κ B compared to the preventive approach could not be proven.

The additive aspirin therapy has successfully been tested in a prophylactic approach in a tumor-mouse-model of pancreatic cancer. If this prophylactic therapy is also effective in human beings remains unclear.

1. Einleitung

1.1 Das Pankreaskarzinom

Das Pankreaskarzinom ist eine hochmaligne Erkrankung mit einer schlechten Prognose. Jährlich erkranken beinahe 14000 Menschen in Deutschland am dukталen Adenokarzinom des Pankreas, dies entspricht ungefähr 3 Prozent der Krebserkrankungen in Deutschland und ist damit die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern und die fünfthäufigste bei Frauen weltweit [2]. In Deutschland ist das Pankreaskarzinom für 6 Prozent der Krebstodesfälle ursächlich [12]. Hieraus lässt sich bereits eine schlechte Prognose für das Pankreaskarzinom erkennen, welche in der häufig späten Diagnosestellung und der aggressiven Tumorzellbiologie begründet ist. Ebenso ist bis zum heutigen Zeitpunkt keine spezifische Früherkennungsmethode bekannt. Zudem sind die Symptome eines Pankreaskarzinoms zunächst unspezifisch, häufig klagen Patienten über Oberbauchbeschwerden wie Schmerzen, die z.B. in den Rücken ausstrahlen, sowie eine unklare Abnahme des Körpergewichts [85].

Die Diagnosestellung erfolgt daher meist erst dann, wenn der Tumor bereits den Abfluss der Pankreas-, und Gallenwege verlegt hat, was mit einem Ikterus einhergehen kann und typisch für eine Lokalisation des Tumors im Bereich des Pankreaskopfes ist, wo sich ca. 70 Prozent der Pankreaskarzinome manifestieren. Weitere 20 Prozent treten im Korpusbereich, 10 Prozent im Pankreasschwanz auf [85].

Ein weiteres Kriterium für die Überlebensprognose ist die onkologische Resektabilität, d.h. die Möglichkeit, durch eine Operation makroskopische und mikroskopische Tumorfreiheit zu erreichen. Diese ist bei Diagnosestellung in nur 10-20 Prozent der Fälle gegeben. Bei diesem geringen Anteil der Patienten beträgt die mediane Überlebenszeit 10-12 Monate und kann durch eine adjuvante Chemotherapie auf bis zu 20 Monate verlängert werden. In den restlichen 80-90 Prozent ist die Prognose noch verheerender. Hier liegen nicht resektable Tumorstadien vor, die mediane Überlebenserwartung liegt ohne Therapie bei 3-4 Monaten. Insgesamt beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate weniger als 2 Prozent [64].

Die bisher einzige Heilungschance ist die chirurgische R0-Resektion, die kurativen Möglichkeiten der Radio- oder Chemotherapie sind kaum erfolgsversprechend [28]. Jedoch zeigen verschiedene Studien eine signifikante

Überlebensverlängerung durch verschiedene Chemotherapieprotokolle [20].

In palliativen Situationen kann die chirurgische Wiederherstellung des Galleabflusses, sowie der Magen-Darm-Passage sinnvoll sein [85]. Weiterhin kann eine Radiochemotherapie das Überleben etwas verlängern und einen Zugewinn an Lebensqualität, z.B. durch Linderung von Metastasenschmerzen bringen [96].

Da die zum heutigen Zeitpunkt bekannten Therapieoptionen äußerst unbefriedigend sind wird intensiv sowohl an der Entstehung, als auch an der Therapie des Pankreaskarzinoms geforscht.

Ähnlich der Adenom-Karzinom-Sequenz die die Entstehung von Kolonpolypen zu Karzinomen für das kolorektale Karzinom beschreibt [63], wird auch beim Pankreaskarzinom eine Sequenz von molekularen Veränderungen für die Entstehung von invasiven Tumoren aus Pankreasgangdysplasien vermutet, in der ebenso eine Abfolge von verschiedenen Mutationen für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht wird [40].

In der Entstehung des Pankreaskarzinoms aus dem Gangepithel des Pankreasgangs werden Transformationsprozesse duktaler Zellen klassifiziert, die als sogenannte *Pancreatic Intraepithelial Neoplasias* (PanIN) bezeichnet werden. PanINs entwickeln sich über flache Epithelhyperplasien ohne Atypien (PanIN-1A) und papilläre Hyperplasien ohne oder mit Atypien (PanIN-1B oder 2). Der weitere Transformationsprozess kann sowohl zur Entwicklung eines Carcinoma in situ (PanIN-3), als auch zum invasiven Pankreaskarzinom führen (Abb. 1)[40,59].

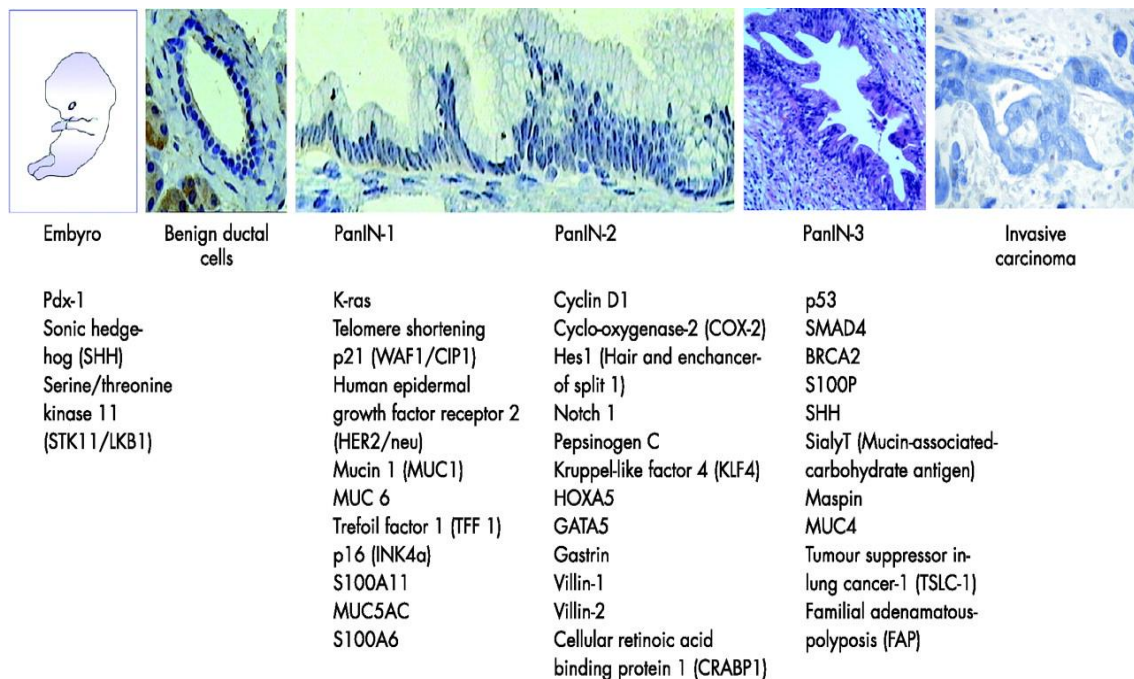


Abb1.: PanIN Progression mit stadienabhängigen Mutationen [32].

Aufgrund der überaus schlechten Prognose des Pankreaskarzinoms sind Verbesserungen in der Diagnostik sowie der Therapie dringend nötig. Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung sind zur Zeit nicht sinnvoll einsetzbar, da Marker für z.B. PanIN-Läsionen oder andere Vorläuferläsionen nicht oder nicht spezifisch genug messbar sind [88]. Für Patienten mit einem deutlich erhöhten Risiko für ein Pankreaskarzinom, z.B. mit chronischer Pankreatitis oder familiärer Belastung wären daher Optionen für die Prävention des Pankreaskarzinoms wünschenswert. Einige neue Ansätze bieten hier hoffnungsvolle Möglichkeiten die PanIN-Progression und die Entstehung von Pankreaskarzinomen zu verlangsamen oder gar zu verhindern [27].

Trotzdem ist eine drastische Verbesserung der Therapie unumgänglich. Inzwischen stehen Tiermodelle zur Verfügung, die in der Lage sind die Progression des Pankreaskarzinoms ähnlich der des Menschen nachzubilden [40,44]. Hierdurch offenbart sich eine wertvolle Möglichkeit Substanzen und Präventions-, wie Therapieansätze experimentell zu testen.

1.2 Molekulare Ursachen des Pankreaskarzinoms

Die molekularen Veränderungen in Pankreaskarzinomzellen und ihren Vorläufern, den Gangepithelzellen der Pankreasgänge betreffen Gene, die einerseits für Proteine für proliferative Vorgänge kodieren, oder andererseits für

solche die die Kontrolle des Zellzyklus übernehmen und antiproliferativ wirken. Ein Beispiel für ein solches Onkogen ist das K-ras-Onkogen, welches in vielen malignen Tumoren mutiert ist [49] und teilweise auch im gesunden Pankreasgewebe, sowie der chronischen Pankreatitis vorgefunden wird und bereits in ca. 30 Prozent der frühen PanIN-Läsionen nachweisbar ist. In invasiven Pankreaskarzinomen liegt in über 90 Prozent eine Mutation im K-ras-Gen vor [3, 49, 80].

Tabelle			
Häufig veränderte Gene des Pankreaskarzinoms			
Gen	Lokus	LOH*¹	Alterationsfrequenz*²
K-ras	12p12	nicht anwendbar	100% (59, 60)
p53	17p13	100% (26)	76% (59, 60)
p16 ^{INK4}	9p21	85% (9)	96% (9, 63)
DPC4	18q21.1	91% (25)	50% (25)

*¹ Heterozygote Deletionen oder loss of heterozygosity (LOH) wurden mit Hilfe einer PCR-Analyse von Mikrosatelliten bestimmt. Die Prozentangaben repräsentieren diejenige Fraktion der Karzinome, die einen oder mehrere Mikrosatelliten-Marker auf dem jeweiligen chromosomalen Arm verloren hatten.

*² Genetische Alterationen sind wie folgt angegeben: Für K-ras und p53 wurden lediglich die Sequenzveränderungen in die Berechnung eingeschlossen; für p16 und DPC4 wurden die homozygoten Deletionen und die Sequenzveränderungen aufaddiert.

Tabelle 1.: Häufig veränderte Gene des Pankreaskarzinoms [23].

Eines der am häufigsten in menschlichen Tumoren mutierte Gen ist das Tumorsupressorgen p53, dessen Genprodukt p53 als Transkriptionsfaktor für den Zellzyklusarrest sowie die Apoptoseinduktion wichtig ist. Auch im humanen Pankreaskarzinom ist p53 in ca. 60 Prozent der Läsionen ab PanIN 2-3 inaktiviert und führt zu genomischer Instabilität [8,14].

1.2.1 Das K-ras Onkogen

Zur Ras-Familie gehören viele wichtige G-Proteine wie K-ras, Rac und Rho, die eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion, insbesondere für die Zellproliferation, spielen. G-Proteine wie Ras liegen in zwei Zuständen vor. Mit gebundenem GDP verhält sich das Protein inaktiv und wird durch den Austausch gegen GTP in die aktive Form überführt [16]. Dies geschieht durch den Guaninnucleotid-Austauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*,

GNEF). Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der G-Proteine wird die aktivierte Form jedoch rasch in die Inaktive zurückgeführt. Diese Reaktion wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) beschleunigt. Die GNEF sorgen für die Aktivierung der G-Proteine und binden durch Adapterproteine an der Zellmembran, dem Ort der Rezeptoraktivierung (Abb. 2a) [21].

Die G-Proteine fungieren als molekulare Schalter und so ist auch Ras in der Lage an unterschiedlichen Effektoren zu binden und diese zu aktivieren. Vier wichtige Ras-Effektorsignalwege sind : (a) Der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg, (b) der Ras-PIK3-Akt-Signalweg, (c) der Ras-Phospholipase-Signalweg und (d) der Ras-Ral-GEF-Signalweg [16,72]. Die aktivierten Ras-Effektorsignalwege spielen eine wichtige Rolle in Genexpression, Zellzyklusprogression, Zellüberleben und Differenzierung (Abb. 2b).

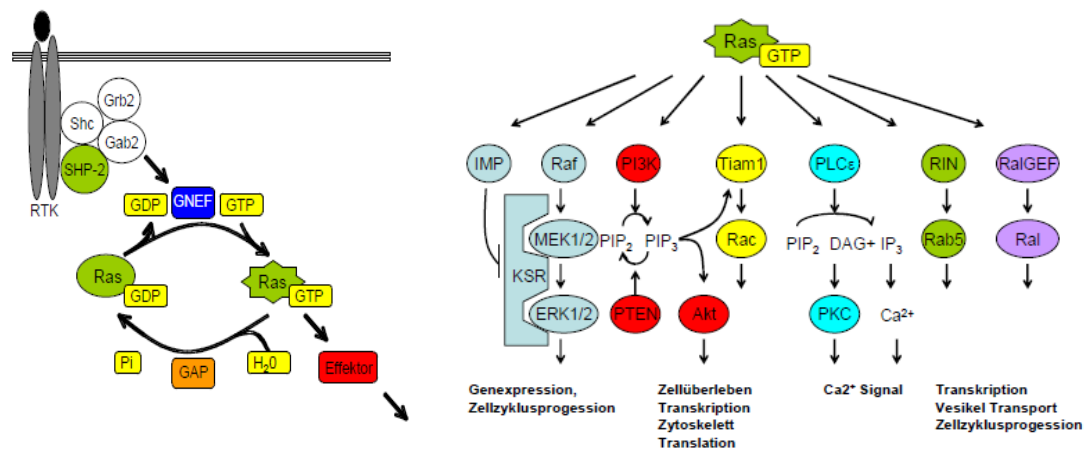


Abb. 2a: Aktivierung der Signalwege von Ras 2b: aktivierte Ras-Effektorsignalwege [72].

Mutationen im Ras-Gen finden sich in vielen humanen malignen Tumoren, wie dem kolorektalen Karzinom, welches der häufigste solide maligne Tumor in Deutschland ist, und konnten hier als eine der Hauptursachen identifiziert werden [12]. Hier ist insbesondere die Möglichkeit der Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen EGFR von großer Bedeutung. Entscheidend ist hier die Kenntnis des K-ras Mutationsstatus, da eine Therapie mit o.g. Antikörpern nur im Fall eines K-ras-Wildtyps sinnvoll ist. In soliden Tumoren findet sich die meist die K-ras-Form wieder [3]. Eine andere Form von Ras, N-ras, findet sich z.B. in den Zellen der akuten myeloischen Leukämie mutiert [13].

1.2.1.1 Die Rolle von K-ras in der Tumorgenese des Pankreaskarzinoms

Das K-ras-Gen kodiert für das an die Plasmamembran gebundene 21-KD große Guaninnukleotid-bindende-Protein Ras. Dieses besitzt eine Guanosin-Triphosphatase-Aktivität (GTPase-Aktivität), welche die Aktivität des Proteins über den Austausch von GDP gegen GTP reguliert [72]. Mutationen im K-ras Onkogen können zu einem Verlust der GTPase-Aktivität von Ras führen und somit dessen aktivierten Zustand stabilisieren, wodurch die downstream von Ras gelegenen Signaltransduktionswege beeinflusst werden [21]. Diese nehmen eine zentrale Rolle in der Regulation des Zellzyklus, der Differenzierung und der Proliferation ein. Mutationen im K-ras-Onkogen begünstigen daher die Tumorentstehung, so auch im Pankreaskarzinom, wo K-ras-Mutationen in 80-90% der Zellen nachweisbar sind [46]. Doch auch im PanIN Stadium 1a/b ist K-ras in bis zu 40% der Zellen mutiert. Dies lässt den Schluss nahelegen, dass K-ras eine Rolle in der Initiierung der Kanzerogenese spielt [44, 69].

1.2.2 Das Tumorsuppressorgen p53

Das Tumorsuppressorgen p53 ist auf Chromosom 17p13.1 lokalisiert und kodiert für ein nukleäres Protein der Größe 53 kDa, welches eine entscheidende Rolle in der Zellzykluskontrolle spielt. In humanen Tumoren sind Mutationen an unterschiedlichen Positionen im p53-Gen die am häufigsten nachweisbaren [42]. Der p53-Wildtyp reguliert die Zellzykluskontrolle am Übergang der G1-, in die S-Phase, am Übergang S-G2-Phase und G2-M-Phase. p53 induziert hier die Kontrolle der den Zellzyklus aktivierenden Cycline und ihren Cyclin-abhängigen-Kinasen, den sog. CDK [55]. Kommt es zu einer DNA-Schädigung, wirkt das p53-Gen als Transkriptionsfaktor für die Synthese von p21, welches durch die Hemmung der CDK2 einen Zellzyklusarrest bewirkt, sodass die Teilung einer geschädigten Zelle verhindert wird (Abb.3) [66]. Zudem ist p53 in der Lage proapoptotische Proteine wie NOXA und Bax zu aktivieren und so über die Aktivierung von Caspase 9 und Caspase 3 den programmierten Zelltod, die Apoptose, einzuleiten [70]. Zudem scheint p53 in der Lage zu sein direkt an die DNA zu binden und hier proapoptotische Targetgene zu aktivieren

[89]. Fällt dieser Kontrollmechanismus aus, begünstigt dies die Kanzerogenese und führt zur genomischen Instabilität von Tumorzellen [55].

1.2.2.1 Der Tumorsuppressor p53 im Pankreaskarzinom

In über 50% der malignen Tumoren ist eine Mutation des Tumorsuppressorgens p53 nachweisbar, beim Pankreaskarzinom sogar in über 70% der Fälle [8,14]. Diese p53-Mutationen haben Einfluss auf die Dysplasie und treten in fortgeschrittenen Läsionen (PanIN2/3) auf. Ein Verlust der Funktion von p53 begünstigt die Zellproliferation und verhindert die Apoptose und scheint für eine schnellere Progression des Pankreaskarzinoms, nicht jedoch für die Metastasierung verantwortlich zu sein. Weiterhin scheint der Nachweis von p53-Antikörpern im Pankreassaft spezifisch für maligne Prozesse bei Patienten mit chronischer Pankreatitis zu sein [57].

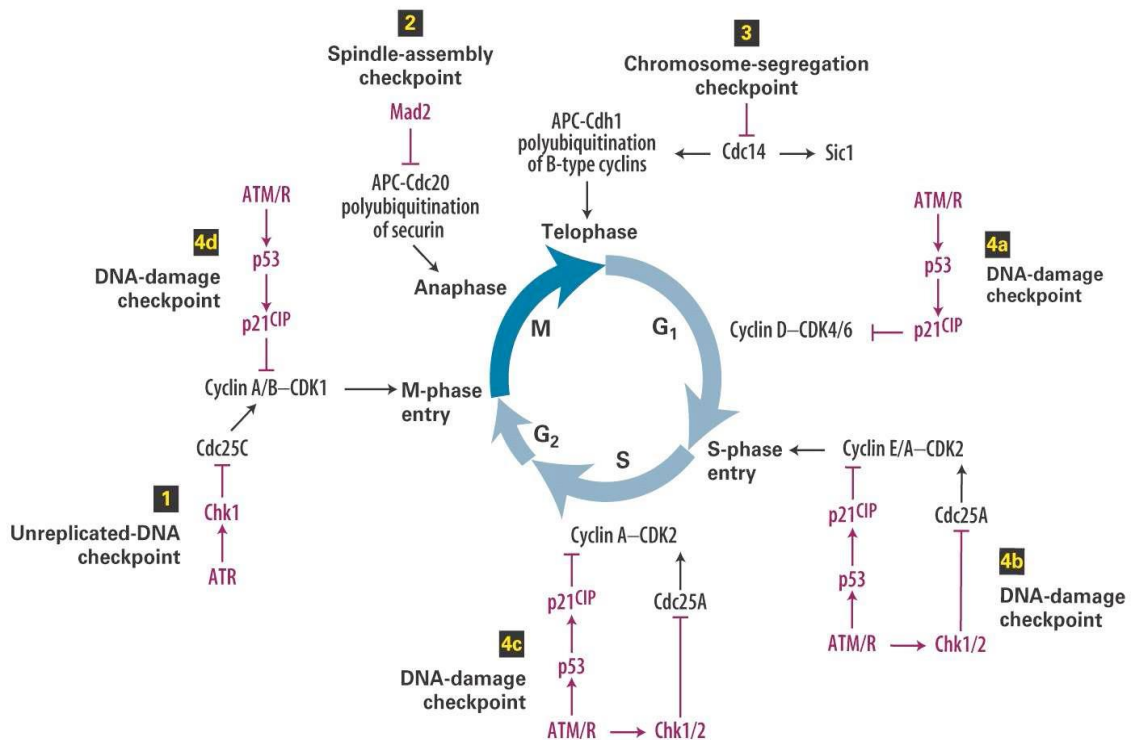


Abb.3 Einfluss von p53 auf den Zellzyklus (66).

1.3 Molekulare Signalwege im Pankreaskarzinom

Durch die folgenden Signalwege werden Angiogenese, Proliferation und Hypertrophie induziert.

1.3.1 Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) ist ein transmembranes Glykoprotein, das aus einer extrazellulären Liganden-Verbindungsstelle mit Cystein-reichen Regionen, einem hydrophoben Transmembrangebiet und einer intrazellulären Tyrosin-Kinase besteht. EGFR ist Mitglied der ErbB-Familie oder EGFR-Familie mit Tyrosinkinase-Rezeptoren, die EGFR-1, ErbB-2 (HER-2), ErbB-3 und ErbB-4 umfasst. EGFR gehört auch zu den Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, sodass die Überexpression von ErbB-Signalwegen eine entscheidende Rolle im Wachstum von malignen Tumoren spielt. Beim Pankreaskarzinom werden EGFR-1, ErbB-2 und ErbB-3 überexprimiert [29, 76, 98]. Die Bindung von Liganden an die extrazelluläre Komponente von EGFR führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase, wodurch die intrazellulären Signalwege aktiviert werden (Abb. 4), die den Ras-Raf-MAPK-, (Übertragung von Wachstumssignalen) und den PI3K/Akt-Signalweg (Kontrolle von Zellzyklusprogression und Zellüberleben) induzieren [21, 61]. Hierdurch kommt es zu vermehrtem Zellwachstum. Die Möglichkeit der Hemmung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) wurde mit großen Hoffnungen in eine Verbesserung der Behandlung angesehen [41]. Das Medikament Erlotinib zeigte in der Behandlung des Pankreaskarzinoms einen Vorteil im Überleben der untersuchten Patienten. Dieser erwies sich jedoch als derart klein, dass man die Inhibition des EGFR nicht als einen Durchbruch in der Therapie bezeichnen kann [62]. Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass der Mechanismus zwar wirkt, aber nicht alleine für die Tumorgenese und Progression verantwortlich sein wird [16].

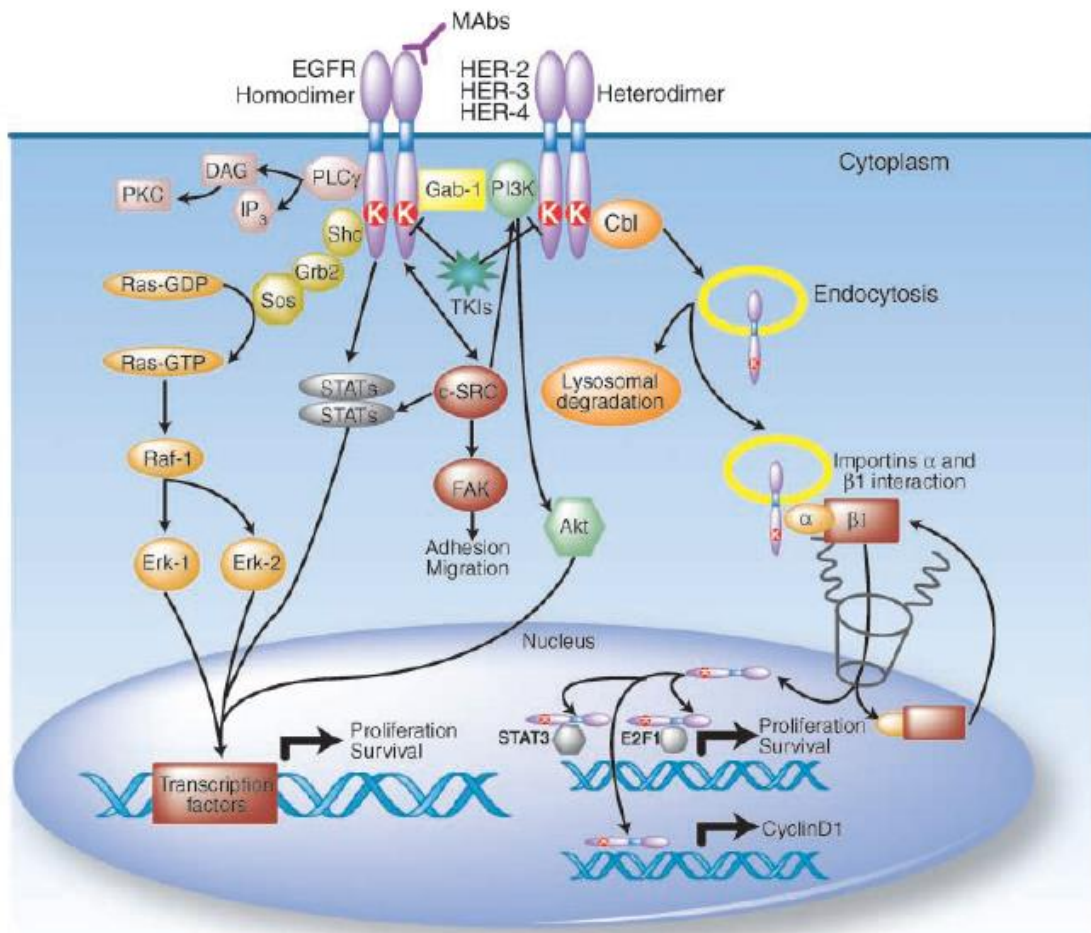
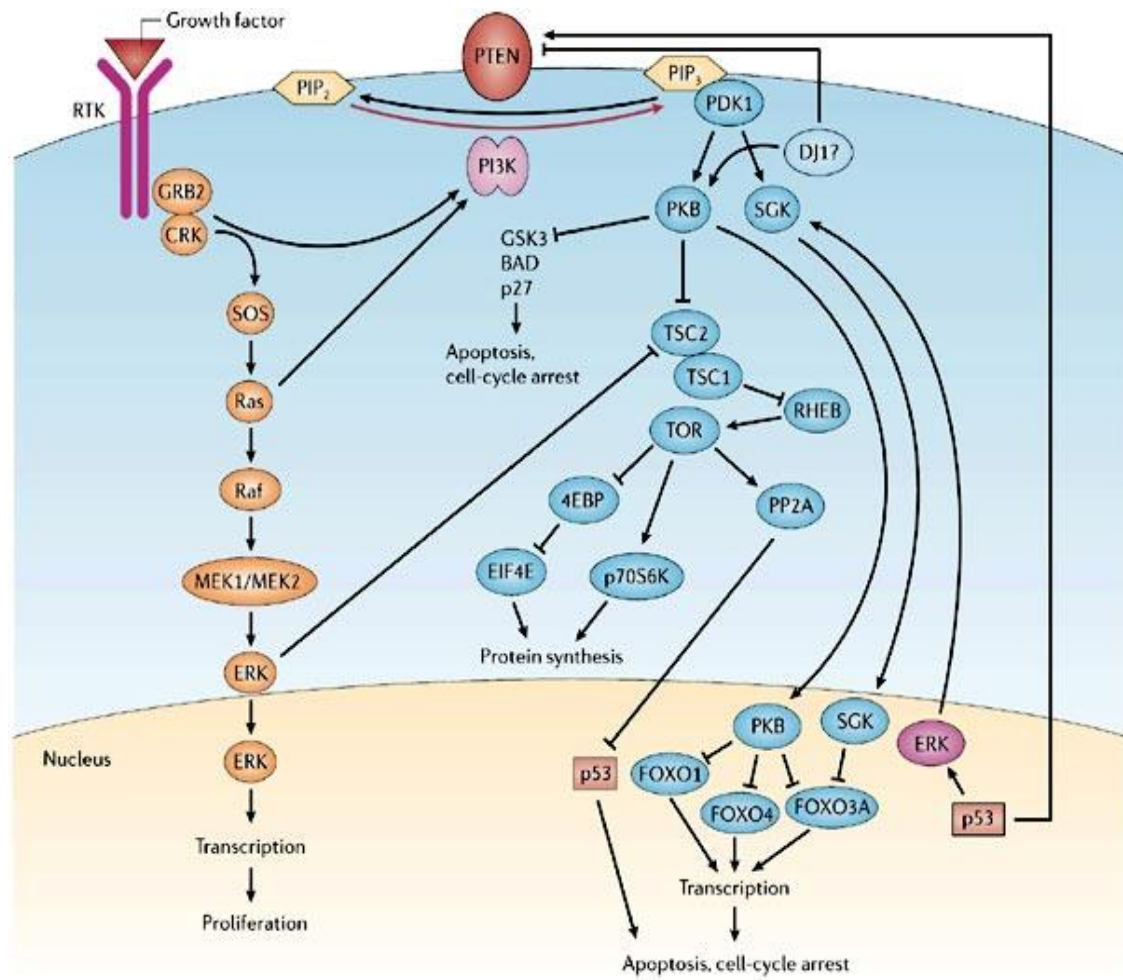


Abb.4 Schematische Darstellung des EGFR-Signalwegs im Pankreaskarzinom [76].

1.3.2 PI3K/Akt-Signalwege

Durch die Bindung von Liganden an den transmembranen VEGF-, EGFR, HGF-, Insulin-like growth factor-Rezeptor (IGFR) und Ras wird der PI3K/Akt-Signalweg aktiviert (Abb. 5). Die aktivierte Phosphoinositol-3-OH-Kinase (PI3K) katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositol-4,5-bisphosphat zu Phosphoinositol-3,4,5-trisphosphat. Hierdurch wird die Phosphoinositol-dependent-Kinase 1 (PDK1) aktiviert, welche Akt stimuliert [72]. Der PI3K/Akt-Signalweg induziert weitere Signaltransduktionen und stimuliert den G1/S-Übergang im Zellzyklus [94]. Durch Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren "nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells" (NF- κ B) und "mammalian target of rapamycin" (mTOR) fördert Akt die

Proliferation und das Überleben der Zelle [94]. Die Aktivität des PI3K/Akt-Signalwegs wird durch das Tumorsuppressorgen PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) gehemmt [95]. Akt phosphoryliert verschiedene Moleküle, die eine entscheidende Rolle im Zellwachstum, Überleben, Glukosestoffwechsel und der Proliferation spielen. Akt inhibiert die Funktion der proapoptotischen Proteine der Bcl2-Klasse, wie den Bcl2-Antagonist-causing-cell-death (Bad) und die Caspase 9 [79]. mTOR reguliert den Zellstoffwechsel, die Zellproliferation und das Wachstum von Pankreaskarzinomzellen [9,34,82] und zeigt eine erhöhte Aktivität in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien sowie in resezierten Pankreaskarzinomen [9,10]. Dies gilt auch für NF- κ B, welches die Immunantwort, die Zellproliferation und die Apoptose reguliert. Die Aktivierung von NF- κ B spielt eine wichtige Rolle in der Entstehung von Entzündungen und der Entwicklung des Immunsystems. Es konnte gezeigt werden, dass der PI3K/Akt-Signalweg das Überleben der Zellen fördert und eine wichtige Rolle in der Tumorgenese spielt [37]. Die Überexpression von Akt1 wurde im Magenkarzinom [100], die Überexpression von Akt2 im Mamma-, Ovarial-, und Pankreaskarzinom festgestellt [38]. In mehreren experimentellen Studien wurde bei bis zu 60% der Patienten mit einem Pankreaskarzinom eine verstärkte Aktivierung von Akt und des PI3K/Akt-Signalweges im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe und benignen Pankreastumoren festgestellt. Insbesondere bei schlecht differenzierten Pankreaskarzinomen fand sich eine starke Akt-Aktivierung [4,19,73,78]. Es wird angenommen, dass eine PTEN-Mutation grundlegend für die Karzinogenese ist [75]. Die Inhibierung des PI3K-Akt-Signalweges wird daher als ein neuer Therapieansatz beim Pankreaskarzinom angesehen [74].



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Abb. 5: Der PI3K/Akt-Signalweg [20].

1.4 Cyclooxygenasen

Cyclooxygenasen (COX) sind globuläre Proteine mit einer molaren Masse von 67 bis 72 kDa, die eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandinen sowie bei Inflammationsprozessen spielen (Abb.6). Es existieren zwei Subtypen der Cyclooxygenase (COX-1 und COX-2). Die COX-1 wird in nahezu allen Geweben exprimiert, z.B. in Thrombozyten, in Endothelzellen sowie im Rückenmark [67]. Die Funktionen der von COX-1 gebildeten Prostaglandine dienen der Gewebeprotektion, wie dem Schutz der Magenschleimhaut durch Steigerung der Durchblutung und Drosselung der Magensaftsekretion sowie der Thrombozytenaggregation. Die COX-2 wird permanent im ZNS und in der Niere sowie zyklisch in Uterus, Tuben und

Ovarien gebildet, unterliegt allerdings in hohem Maß Regulationsvorgängen, insbesondere bei Stress oder Entzündungen, wodurch ihre Aktivität bis auf das Hundertfache ansteigen kann. Inflammationsmediatoren wie der Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α) oder Interleukin-1 induzieren z.B. im Hypothalamus die COX-2 und lösen so Fieber aus. Ebenso führt die gesteigerte Prostaglandinsynthese zur Inflammation im Gewebe mit Ihren typischen Symptomen. Die COX-2 wird durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Tumorkongenome stimuliert.

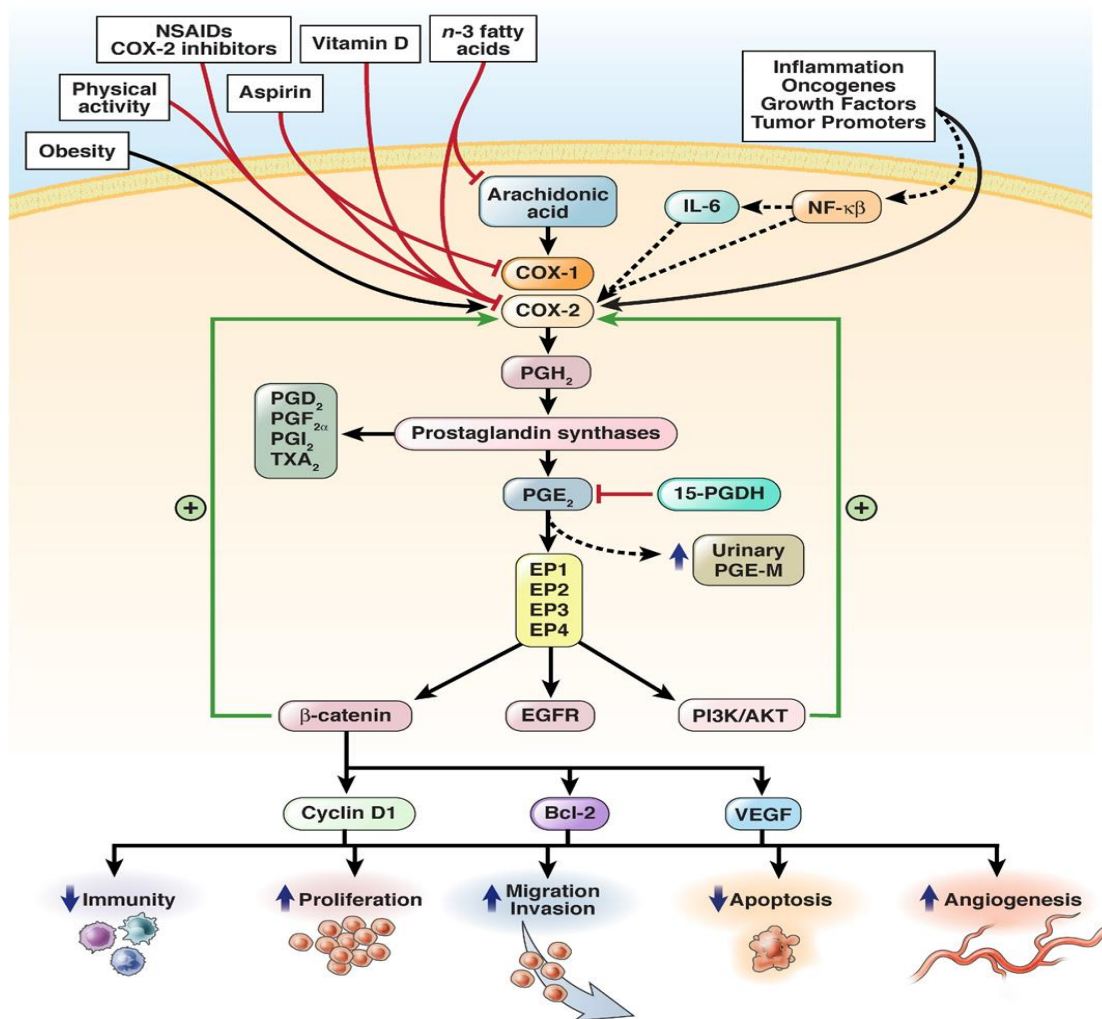


Abb.6: Cyclooxygenase abhängige Effekte und Aktivatoren (schwarz) sowie Suppressoren (rot) [18].

1.4.1 Die Cyclooxygenase-2-Expression beim Pankreaskarzinom

Die Überexpression von COX-2 konnte sowohl in epithelialen, als auch in nichtepithelialen Karzinomen nachgewiesen werden und geht mit einer

schlechten Prognose beim Ösophagus-, Magen-, Kolon-, Mamma-, sowie beim Ovarialkarzinom einher [87]. 90% der Pankreaskarzinomfälle weisen eine Überexpression der COX-2 auf und bemerkenswerterweise stieg der Grad der COX-2-Expression parallel mit dem Grad der PanIN-Läsionen an [92]. Die Mechanismen der COX- und Prostaglandin-vermittelten Effekte auf die Kanzerogenese beim Pankreaskarzinom sind komplex und betreffen verschiedene mitogene Signalwege, die die Apoptoseresistenz, Zellmigration, Invasion, Angiogenese und Produktion von freien Radikalen positiv beeinflussen [24]. Im $Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre$ Mausmodell von Hingorani et al. konnte bereits in den PanINs der Mäuse eine starke Expression der COX-2 nachgewiesen werden (Abb.7) [39]. Die Inhibierung der COX-2 wird daher als eine neue Form der Chemoprävention bei Risikopatienten, z.B. mit chronischer Pankreatitis oder familiärer Belastung, angesehen und konnte vor kurzem erstmals erfolgreich im Mausmodell durchgeführt und bewiesen werden [27].

Der nächste Schritt war folglich die Überprüfung der COX-Inhibition als Therapieoption.

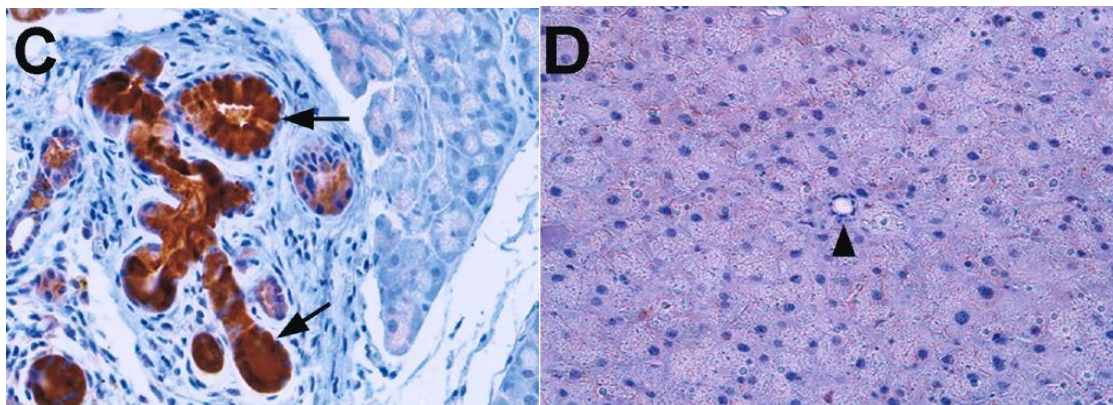


Abb.7: Stark positive Expression von COX-2 in PanINs (C), fehlende Expression (D) in normalen Pankreasgängen [24].

1.4.2 Acetylsalicylsäure

Die Cyclooxygenasen werden durch eine Reihe nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR) irreversibel gehemmt, zu denen ebenfalls die Acetylsalicylsäure (ASS) gehört. ASS ist nicht nur in der Lage die Prostaglandinsynthese zu hemmen, sondern steigert auch die Enzymaktivität zur Oxidation von Eicosapentaensäure

und Decosahexaensäure und zur Synthese von Resolvinen und Protectinen. Hierdurch sinkt die Bildung gleich mehrerer Prostaglandine, sodass ASS vielfältige Wirkungen im Prostaglandinstoffwechsel erzeugt [56]. Die verminderte Biosynthese des Prostaglandins E₂ (PGE₂) ist für den analgetischen Effekt von ASS verantwortlich. Ein weiterer Effekt der Acetylsalicylsäure ist die Hemmung der Thrombozytenaggregation, indem sie den Thromboxan-A₂-Gehalt der Thrombozyten senkt [86]. Die Dauerbehandlung mit niedrig dosiertem ASS ist therapeutischer Standard bei Postmyocardinfarktpatienten zur Unterdrückung der Plättchenaggregation [65]. Die zum Erhalt der Magenschleimhaut-protectiven Effekte der COX-1 entwickelten, spezifischen Hemmstoffe der COX-2 sind in mehreren klinischen Studien, z. B. bei Patienten mit sporadischen adenomatösen Kolonpolypen auf ihre chemopräventive Wirksamkeit getestet worden, da in einer Vielzahl von prämaligen und malignen Läsionen eine erheblich gesteigerte Expression der induzierbaren Isoform COX-2 der Cyclooxygenasen nachgewiesen wurde [6, 25,26,83,89]. Hier konnte gezeigt werden, dass selektive COX-2-Inhibitoren das Tumorwachstum supprimieren und eine Apoptose von Tumorzellen induzieren. Hierfür wird eine Hemmung der proliferationsfördernden Effekte von PGE₂ [84], der COX-2-abhängigen Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR- δ und der COX-2-induzierten Angiogenese postuliert [91]. Weitere COX-unabhängige Mechanismen, die ASS zugesprochen werden, beinhalten die proapoptotische Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B oder die direkte Hemmung von PPAR- δ . In einigen Zellen, z.B. B-Lymphozyten, ist NF- κ B dauerhaft im Zellkern vorhanden und konstitutiv aktiv. In den meisten anderen Zelltypen liegt NF- κ B dagegen physiologisch inaktiv im Zytoplasma vor. Durch Wachstumsfaktoren, Zytokine (z.B. TNF- α), bakterielle und virale Antigene und chemisch-physikalische Noxen (z.B. UV-Strahlung, freie Radikale) wird NF- κ B aktiviert [33]. Er spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung antiapoptotischer und inflammatorischer Signalwege und reguliert die Expression von vielen Genen, die beim Zellwachstum, der Zellproliferation, der Apoptose und der Tumorangiogenese eine wichtige Rolle spielen [33]. Schließlich findet man in einer Vielzahl unterschiedlicher Tumorentitäten eine NF- κ B-Deregulation [58]. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von NF- κ B die Expression von COX-2 stimuliert. Ebenso wird NF- κ B im Pankreaskarzinom überexprimiert [8]. In einer Kohortenstudie konnte bei Patienten mit regulärer Einnahme von ASS

im Vergleich zu Patienten ohne ASS-Einnahme ein niedrigeres relatives Risiko (RR=0.57) für die Entstehung eines Pankreaskarzinoms gezeigt werden. Dies gilt auch für Patienten, die ASS in höheren Dosen zu sich nehmen ($p=0.05$). Laut dieser Studie könnte die Einnahme von ASS oder einem anderen NSAR als Chemoprävention gegen das Pankreaskarzinom angesehen werden [5].

1.5 Gemcitabine

Das Zytostatikum Gemcitabine (Gemzar®) (2'-Deoxy-2',2'-diflourocytidinmonohydrochlorid) ist ein Nukleosidanalogen der Gruppe der Pyrimidine. Im Gegensatz zum natürlich vorkommenden zellulären Deoxycytidin sind an der 2'-Position des Zuckermoleküles zwei Fluoratome substituiert [92]. Gemcitabine wird nach Phosphorylierung durch die Deoxycytidinkinase zur Triphosphatform (dFdCTP) als falsches Nukleotid in die DNA eingebaut [7]. Dies verhindert die DNA-Elongation und führt zum Strangabbruch und Zelltod. Die verzögerte Elimination durch die Desoxycytidineaminase verlängert die intrazelluläre Halbwertszeit von Gemcitabine und führt zu einer Verstärkung der zytostatischen Wirkung [36]. Eine Besonderheit von Gemcitabine ist der sog. maskierte Kettenabbruch. Dabei wird nach dem Basenanalogen ein natürliches Nukleotid angefügt und damit Reparaturenzyme der DNA gehemmt.

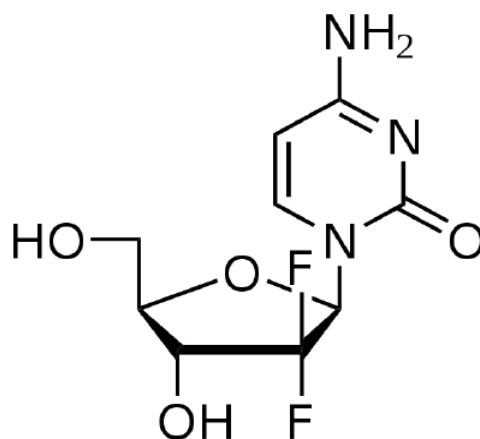


Abbildung 8: Strukturformel von Gemcitabine.

1.6 Das Pankreaskarzinom im Tumormausmodell

Die Arbeitsgruppe um Dave Tuveson entwickelte im Jahr 2003 ein Tumormausmodell, in dem eine onkogene Form von K-ras unter der Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx1-Promotors exprimiert wird [39]. Die Mutation wird von Lox-Stop-Lox (LSL)-Elementen flankiert, die die Transkription und Translation zunächst verhindern. Das mutierte Allel wird exprimiert, indem die LSL-Kras^{G12D}-Mäuse mit Mäusen gekreuzt werden, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pdx1-Promotors exprimieren. Hierdurch wird das LSL-Element herausgeschnitten und die onkogene Form des K-ras Proteins exprimiert [39]. Die aktivierenden Mutationen treten in der Regel an bestimmten Stellen des Ras-Gens (T→A Transversion in Kodon 12, 13 und 61) auf. K-ras-Mutationen sind in den frühen PanIN-Läsionen nachweisbar und ihre Prävalenz nimmt auf bis zu 90% im duktalem invasiven Karzinom zu. Die K-ras-Mutation ist häufig mit einer chronischen Pankreatitis assoziiert, tritt teilweise aber auch in normalem Pankreasepithel auf [45]. Diese Studie zeigte, dass alle transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse (33 von 33) unterschiedliche PanIN-Läsionen entsprechend den humanen Vorläufern des Pankreaskarzinoms entwickelten.

Hierbei durchläuft die Karzinogenese des Pankreaskarzinoms im Mausmodell, ähnlich der beim Menschen beobachteten Entstehung, die verschiedenen Stufen der pankreatischen intraepithelialen Neoplasien (PanIN). Es konnten zudem Überexpressionen von verschiedenen Proteinen, z.B. COX-2 und Matrix-Metalloprotease 7 (MMP-7) in den Gangepithelien nachgewiesen werden. Zusätzlich zu PanIN-Läsionen entwickelten die transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse mucocutane Papillome und intestinale Neoplasien. In 6,6% der transgenen Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse (2 von 29) konnten Hingorani et al. invasive und metastasierte Pankreaskarzinome nachweisen, welche mit einer Latenz von ungefähr 6 Monaten auftraten [40]. Das Tumormausmodell wurde im Jahr 2005 durch die Arbeitsgruppe um Hingorani und Tuveson weiterentwickelt, indem nicht nur die onkogene Form von K-ras, sondern auch ein Knock-Out des Tumorsuppressors p53 unter der Kontrolle des pankreasspezifischen Pdx1-Promotors exprimiert wird (Abb. 9). Ähnlich des onkogenen K-ras hat man an verschiedenen Stellen des Gens Mutationen

gefunden, die zu einer Fehlfunktion des p53-Proteins führen. Beim Pankreaskarzinom tritt die p53-Mutation in bis zu 70% der Fälle auf [8,14]. Die Effekte des Kreuzens von LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mäusen mit Pdx-1-Cre Mäusen waren dramatisch. Bis zu einem Alter von 4-6 Wochen fanden sich keine histologischen Veränderungen des Pankreas von Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäusen, signifikante Symptome traten frühestens ab einem Lebensalter von 10 Wochen auf [40]. Jedoch hatten LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre Mäuse eine mittlere Überlebenszeit von nur 5 Monaten und alle LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäuse (n=28) starben nach 12 Monaten. Hierbei konnte ebenso wie im ersten Modell 2003 ein Durchlaufen der PanIN-Stadien beobachtet werden, diesmal jedoch mit einer sehr viel schnelleren Ausbildung von Karzinomen. Insgesamt 96% (27/28) der dreifach mutierten Mäuse entwickelten ein invasives Pankreaskarzinom mit nachfolgender Entstehung von malignem Aszites, Kachexie und abdominaler Distension, ebenso wie man es bei Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskarzinom beobachtet (Abb.10). Die Metastasen in den LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mäusen traten wie beim Pankreaskarzinom des Menschen in Leber (70%), Lunge (50-60%), Nebennieren (20%) und Peritoneum (20-30%) auf [40].

Mit der Entwicklung des LSL-Kras^{G12D/+}; LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx-1-Cre Mausmodells war es nun erstmals möglich, Untersuchungen an orthotop wachsenden Pankreaskarzinomen in einem lebenden Organismus durchzuführen, ohne humane oder murine Pankreaskarzinomzelllinien zu injizieren.

In den letzten Jahren konnten einige Medikamente ausgemacht werden, die eine präventive Wirkung auf die Entwicklung von Pankreaskarzinomen beim Menschen haben. Hier konnte z.B. in Veteranenuntersuchungen insbesondere für COX-Hemmer wie Aspirin ein präventiver Effekt gezeigt werden [5,48,77]. Aber auch in Pankreaskarzinomzelllinien ist Aspirin in der Lage, präventiv auf die Ausbildung von Tumorzellformationen zu wirken [82].

Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Gabe eines oral verfügbaren, selektiven COX-2-Inhibitors zu einer verlangsamten PanIN-Progression im

Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mausmodell führen kann [31].

Da in retrospektiven Studien Aspirin und ACE-Hemmern ein präventiver Effekt gegen das Pankreaskarzinom zugeschrieben wird, wurde dieser Aspekt durch unsere Arbeitsgruppe aufgegriffen [50, 53,54,99].

Hierzu wurden sowohl Pdx1-Cre-LSL-Kras^{G12D}-Mäuse als auch die LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre-Mäuse in insgesamt 12 Gruppen mit ASS, dem ACE-Inhibitor Enalapril und einer Kombination aus beiden Medikamenten ab einem Alter von 6 Wochen für jeweils 3 oder 5 Monate behandelt. Nach der jeweiligen Therapiedauer erfolgte die Sektion der euthanasierten Tiere. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von sowohl ASS, Enalapril und der Kombination eine Verlangsamung der PanIN-Progression bewirkt hatte. Dieser Effekt konnte auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. In der Real-Time-PCR zeigte sich eine signifikante Herunterregulierung von mVEGF, von dem bekannt ist, dass es durch ACE-Inhibitoren herunterreguliert werden kann, sowie des RelA Gens, welches für das NF-kB Heterodimer p50/p65 codiert und ebenfalls durch ACE-Hemmer inhibierbar ist. Hieraus ließ sich folgern, dass ASS und Enalapril in der Lage sind als Chemoprävention des Pankreaskarzinoms am LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre Mausmodell zu wirken, indem sie die Progression der Karzinogenese verlangsamen und die Entstehung von invasiven Pankreaskarzinomen partiell verhindern. In der Kombinationstherapie konnte ein synerger Effekt der beiden Medikamente gezeigt werden. Diese Untersuchung konnte erstmals in vivo an einem orthotopen Mausmodell des Pankreaskarzinoms durchgeführt und ein präventiver Effekt dieser Substanzen gezeigt werden [27].

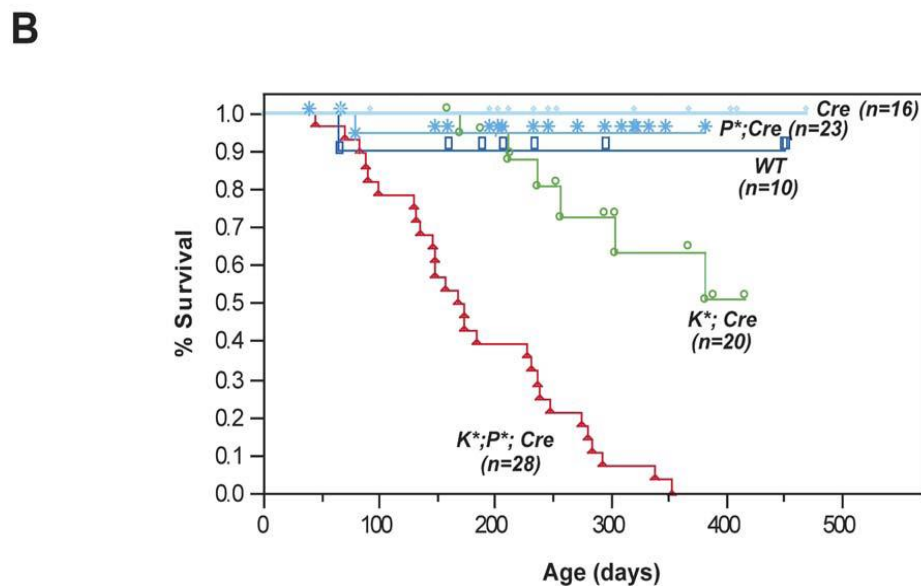
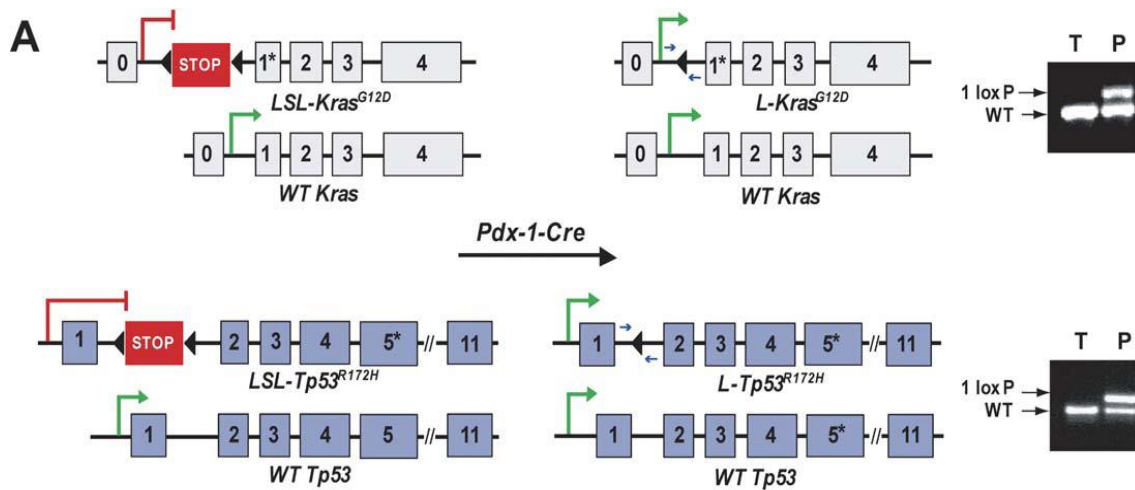


Abb.9: (A)Konstrukt der transgenen LSL-Kras^{G12D}/+;LSL-Trp53^{R172H}/+;Pdx-1-Cre-Mäuse . (B)Überlebenszeit von Mäusen in verschiedenen Gruppen: Rot: LSL-Kras^{G12D}/+;LSL-Trp53^{R172H}/+;Pdx-1-Cre, Grün: LSL-Kras^{G12D}/+;Pdx-1-Cre. Dunkelblau: Wildtyp. Hellblau: LSL-Trp53^{R172H}/+;Pdx-1-Cre. Bzw. Pdx-1-Cre. [40].

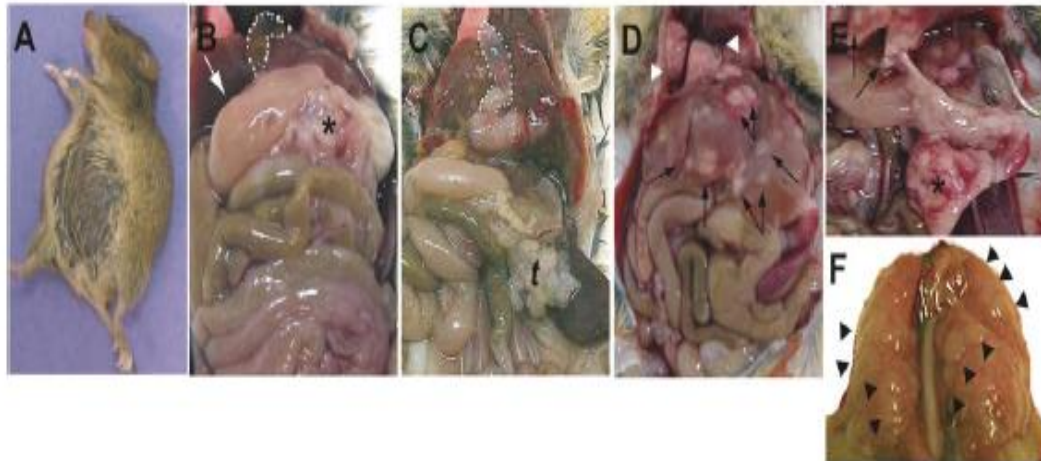


Abb.10: *LSL-KRAS^{G12D/+};LSL-TP53^{R172H/+};Pdx-1-Cre-Mäuse*: (A) Maus mit malignem Aszites, (B) Primäres Pankreaskarzinom (Stern) mit Kompression des proximalen Duodenums (Pfeil), (C) gestaute Gallenblase (markiert), (D) multiple Lebermetastasen, (E) Peritonealkarzinose, (F) Lungenmetastasen [40].

1.7 Zielsetzung

Anhand der Ergebnisse von retrospektiven Studien, die einen präventiven Effekt von Asprin und ACE-Hemmern auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms zeigten, untersuchte unsere Arbeitsgruppe dieses Phänomen am Mausmodell. Hier konnte gezeigt werden, dass Asprin und Enalapril in der Prävention des Pankreaskarzinoms im *Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre* Mausmodell in der Lage sind die Tumorprogression zu verlangsamen und teilweise zu unterbinden [27]. Da die Mehrzahl der Patienten an sporadisch auftretenden Tumoren erkrankt und wir zum heutigen Tag keine effektiven Methoden zur Früherkennung des Pankreaskarzinoms kennen, war der nächste Schritt die Untersuchung der therapeutischen Wirksamkeit dieser Medikamente. Daher soll das Ziel dieser Arbeit sein, zu untersuchen, ob ASS auch in der Chemotherapie als Adjuvans zur derzeitigen Standardtherapie mit Gemcitabine im *Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}; Pdx-1-Cre* Mausmodell in der Lage ist das Überleben der Tiere zu verlängern.

1.8 Fragestellung

In dieser Arbeit sollen in einer Überlebensstudie zur Chemotherapie mit Gemcitabine und adjuvanter Gabe von ASS am $Kras^{G12D/+}, LSL-Trp53^{R172H/+}$; Pdx-1-Cre Mausmodell folgende Fragen geklärt werden:

1. Hat ASS chemotherapeutische Auswirkungen auf die Progression des Pankreaskarzinoms?
2. Hat ASS Auswirkungen auf die Metastasierung von Pankreaskarzinomen?
3. Kann ein Effekt auf molekularer Basis (anhand von immunhistochemischen Färbungen) nachgewiesen werden?
4. Verlängert die additive ASS-Therapie das Überleben?

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Mauslinie

Die in dieser Arbeit verwendeten Tiere entstammen jeweils aus Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+} und LSL-Tpr53^{R172H/+} Mauslinien des Labors des Pancreatic Cancer Research Center der Johns Hopkins University in Baltimore, MD; USA. Diese Tiere wurden bereits zu vorangegangenen Studien aus Baltimore nach Marburg transferiert, und dienten als Zygotenspender für sämtliche verwendeten Mäuse.

2.1.2 Geräte und Zubehör

Gerät	Hersteller
20°C Schrank, Froster	Bosch, Gerlingen, D
- 80°C Schrank, Sepatch	Haraeus, Hanau, D
+ 4°C Schrank, KGS 3213 - 5	Liebherr, Biberach, D
Agarosegelträger, Maxi II	Labortechnik, Wasserburg, D
Analysenwaage, Explorer	Ohaus, Gießen, D
Analysenwaage, 572	Kern, Albstadt, D
Autoklav	Biomedis, Gießen, D
Brutschrank, Thermo B 20	Hareaus, München, D
Destilliere, Arium 611	Sartorius, Göttingen, D
Digitalkamera, Dimage X 50	Konica Minolta, Unterföhring, D
Eismaschine, 072816	ZIEGRA, Isernhagen, D
Elektrophoresenetzgerät, Power Pac 300	BioRad, München, D
Elektrophoreselaufkammer, Sub - Cell GT	BioRad, München, D
Feuchte Kammer	Eigenkonstruktion
Gasbrenner, CV470 Plus Butan/ Propan	Campingaz, Ober-Mörlen, D
Gewebeeinbett- Entwässerungsautomat, Tissue-Tek VIP E150	Sakura, Torrance, USA
Heizblock, Dri - Block DB	Techne, Princeton, USA
Homogenisator/ Shaver, Ultra-Turrax T25 digital	IKA-Werke, Staufen, D
Kühlplatte, Tissue-Tek	Sakura, Torrance, USA
Magnetrührer, MR 2002	Heidolph, Kehlheim, D
Mikroskop (binokular), 020-519.511 (1.6x, 2.5x, 10x, 40x)	Leica, Bensheim, D
Mikroskopkamera, DFC 290	Leica, Bensheim, D
Mikrotom, RM 2155	Leica, Bensheim, D
Mikrowelle, 8017	Privileg, Fürth, D
Markerstift, Super PAP Pen	Zymed, San Francisco, USA
Paraffinspender/ Ausgießstation, Tissue-Tek TEC	Sakura, Torrance, USA

Paraffinstreckbad, WB 24	Medax, Rendsburg, D
Paraffinwärmeplatte, 13501	Medax, Rendsburg, D
pH-Meter, Ultra Basic	Denver Instruments, Göttingen, D
Pipetten, Reference 2,5µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten, Pipetman 20µl, 200 µl	Gilson, Villiers-le-Bel, F
Präparationsbesteck	Aesculap, Tuttlingen, D
qRT-PCR-Gerät, 7500 FAST-Real-Time PCR System	Applied-Biosystems, Darmstadt, D
Quarzküvette, Präzisions-Küvette Suprasil (10mm)	Hellma, Mühlheim/ Baden, D
RNA Photometer, Ultraspec 3000	Pharmacia, Uppsala, S
Schüttelwasserbad, 3047	Lottermann,D
Shavermesser, Surgical Disposable Scalpel	Braun, Melsungen, D
Sterile Werkbank , Nunc 20229	Fisher Scientific, Langenselbold, D
Thermocycler, Mastercycler EP	Eppendorf, Hamburg, D
Thermozentrifuge, Centrifuge 5415-R	Eppendorf, Hamburg, D
Transluminator, Transluminator 4000	Stratagene, Heidelberg, D
Transilluminatorkamera, M 49	Hama, Monheim, D
Tubes, Reaktionsgefäße 1,5ml	Eppendorf, Hamburg
Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Vakuumzentrifuge, Speed Vac Concentrator	Savant, Ramsey, D
Vortexer, REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim, D
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge, Biofuge Pico	Hareaus, München, D

2.1.3 Gebrauchswaren

Produkt	Hersteller
96-Wells-Platten, Thermo-Fast 96 well detection Platten	Steinbrenner Laborsysteme, Wiesenbach, D
Deckgläser, 24x24mm, 24x46mm	Menzel, Braunschweig, D
Einbettkassetten, Bio-Net Einbettkassetten	Engelbrecht, Edermünde, D
Einmalspritzen, 3ml, 10ml	Braun, Melsungen, D
Einmalspritzen/ Insulinspritze, 1ml	Becton Dickinson, Madrid, SPA
Falcon – Röhrchen/ PP-Röhrchen, Cellstar 5ml, 50ml	Greiner , Frickenhausen, D
Feinschliffnadel	
Filtereinheit (steril), MILLEX GP, 0,22µm	Millipore, Schwalbach, D
Filtersystem (steril), Stericup Express PLUS 0,22µm	Millipore, Schwalbach, D
Handschuhe, puderfrei, Nobaglove	Kobe, Marburg, D
Mikrotomklingen, S35	Feather, Osaka, J
Objektträger, SuperFrost Plus	Menzel, Braunschweig, D
Einschlussmittel, Roti - Histokitt II	Roth, Karlsruhe, D
Ohrmarken, 1005 - 1 Manel	National Band &Tag, Newport, USA
Ohrmarkenzange	National Band &Tag, Newport, USA
Petrischalen, Tissue Culture Dishes (94mm x 16mm)	Greiner , Frickenhausen, D
Pipettenspitzen, ep T.I.P.S Standard 200µl, 500µl	Eppendorf, Hamburg, D

Pipettenspitzen (gestopft), SafeSeal 20□l, 100□l	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Eppendorftubes 1,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, Safe Seal Reagiergefäße 2ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Reaktionsgefäße/ Tubes, PP-PCR-Gefäß 0,2ml	Greiner, Frickenhausen, D
Schraubdeckelgefäß	
Skalpelle, steril, Surgical Disposable Scalpel (Gr. 22)	Aesculap, Tuttlingen, D
Wischtücher, Kimwipes Lite	Kimberly - Clark, Koblenz, D

2.1.4 Chemikalien

Die Chemikalien wurden in Analysequalität oder in Qualität für die molekularbiologische Forschung bezogen und verwendet. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur. Die mit *gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol *	Merck, Darmstadt, D
(2-hydroxypropyl)- β - cyclodextrin	Sigma, München, D
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, D
Aqua dest. (steril), Aqua ad iniectabilia	Delta Select, Dreieich, D
Borsäure	Fisher Scientific, Schwerte, D
Bromphenolblau	Sigma, München, D
Citrat	Sigma, München, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Cyclopamin (>99%) *	LC Laboratories, Woburn, USA
DAB Chromogen *	Dako, Hamburg, D
DTT (0,1M)	Roth, Karlsruhe, D
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (99+%)	Arcos Organics, Geel, B
Eosin Lösung, alkoholisch (0,5%)	Sigma - Aldrich, München, D
Ethanol, vergällt ($\geq 99\%$)	Roth, Karlsruhe, D
Ethanol, absolut ($\geq 99\%$)	JT Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid (1%) *	Roth, Karlsruhe, D
Formaldehyd (3,5 – 3,7% neutral gepuffert)	Fischar, Saarbrücken, D
Foramid	Sigma, München, D
Hämalaun, sauer nach Mayer	Dako, Glostrup, DEN
Methanol	Fisher Scientific, Schwerte, D
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt, D
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt, D
Paraffineinbettmedium, Hist- COMP (SP 56°C)	Vogel, Gießen, D
Salzsäure (1 mol/l)	Merck, Darmstadt, D
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (99%+)	Acros Organics, Geel, B
Trizol *	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tween (20%) *	Serva, Heidelberg, D
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck, Darmstadt, D

Xylencyanol
Xylol (≥98%)
Wasser (PCR), steril

Merck, Darmstadt, D
JT Baker, Griesheim, D
Sigma, München, D

2.1.5 Enzyme und Nukleotide

Alle folgenden Enzyme und Nukleotide wurden bei +4°C gelagert.

Produkt	Hersteller
Collagenase P, lyophilisiert	Roche, Mannheim, D
DNA - Größenstandard, Gene Ruler 50bp (0,5µg/ µg)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
dNTPs (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) (10mM)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Reverse Transkriptase, Super Script III (200U/ µl)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNAse (steril)	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.6 Puffer und Stammlösungen

Die folgenden Puffer und Lösungen wurden bei +4°C gelagert.

2.1.6.1 Puffer

Produkt	Hersteller
BSA (pH 5,2)	Serva, Heidelberg, D
DAB Substrat Puffer	Dako, Hamburg, D
DNA Ladepuffer/ Loading Dye (6x)	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
First Strand Buffer (5x), cDNA - Synthese	Invitrogen, Karlsruhe, D
Krebs – Ringer - Puffer	Sigma - Aldrich, München, D
PBS - Dulbecco (1x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, D

2.1.6.2 Stammlösungen

Zum Ansetzen und Verdünnen von Stammlösungen wurde doppelt deionisiertes Wasser verwendet. Wenn ein bestimmter pH-Wert angestrebt wurde, wurde dieser mit Hilfe von Natriumhydroxid (NaOH) bzw. Salzsäure (HCl) eingestellt.

Art der Lösung	Inhalt
Blocking Solution (10%)	1g BSA ad 10ml PBST
Citratpuffer (pH 6,0)	2,94g Citrat ad 1l H ₂ O
DNA-Ladepuffer	40ml Foramid

	40mg Bromphenolblau 40mg Xylencyanol 800µl EDTA (0,5M) pH 8,0 ad 100ml H ₂ O
HBC/ PBS-Lösung (45%)	45g HBC ad 100ml PBS
Krebs – Ringer – Bicarbonat – Puffer (pH 7,3)	9,5g Krebs- Ringer- Fertigpulver 1,26g Natriumbicarbonat (NaHCO ₃) ad 500ml H ₂ O
Methanol- Wasserstoffperoxid- Lösung	10ml H ₂ O ₂ (30%) ad 100ml H ₂ O
PBST (1%)	500µl Tween ad 500ml PBS
TBE (10x), Lagerung bei RT	108g Tris (hydroxymethyl) amino- methane 55g Borsäure 8,2g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat ad 1l H ₂ O

2.1.7 Antikörper

Alle Antikörper und sekundären Konjugate wurden bei +4°C gelagert.

2.1.7.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Ursprungsspezies		Spezifität	Verdünnung	Hersteller
α – NF-κB	Kaninchen	polyklonal	1:100		Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA
α – Amylase	Kaninchen Missouri, USA	polyklonal	1:500		Sigma, Saint Louis,
α – AT1	Ziege	monoklonal	1:100		Santa Cruz, California, USA
α – Nestin	Ziege	polyklonal	1:500		Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Twist(C-17)	Ziege	polyklonal	1:200		Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Pdx 1	Ziege	polyklonal	1:100		Santa Cruz, Heidelberg, D
α – Snail	Ziege	polyklonal	1:100		Santa Cruz, Heidelberg, D

2.1.7.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
α – Meerschweinchen	Peroxidase	1:250	Vectastain, Burlingame, USA
α – Ziege	Peroxidase	1:250	Vectastain, Burlingame, USA
α – Kaninchen	Peroxidase	1:250	Vectastain, Burlingame, USA
α – Maus	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.7.3 Sekundäre Konjugate

Konjugatkomplex	Kopplung	Verdünnung	Hersteller
Avidin – Biotin	Peroxidase	1:40	Vectastatin, Burlingame, USA
Streptavidin - Biotin	Peroxidase	1:1	Zymed, San Francisco, USA

2.1.8 Primer

Die verwendeten PCR- Primer wurden von der Firma *Eurofins MWG* (Ebersberg, D) bezogen und bei -20°C gelagert.

Genotyp	Primername	5'-3'- Primersequenz	Fragmentgröße
K-ras	K-ras WT FW	GTC GAC AAG CTC ATG CGG GTG	500bp
	K-ras 006 WT REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
	K-ras Mutant FW	AGC TAG CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC	550bp
	K-ras 006 Mutant REV	CCT TTA CAA GCG CAC GCA GAC TGT AGA	
P53	P53 WT FW	TTA CAC ATC CAG CCT CTG TGG	170bp
	P53 WT REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
	P53 Mutant FW	AGC TAg CCA CCA TGG CTT GAG TAA GTC TGC A	270bp
	P53 Mutant REV	CTT GGA GAC ATA GCC ACA CTG	
Cre	Cre FW	CCT GGA AAA TGC TTG TGT CCG	400bp
	Cre Cre FW	CAG GGT GTT ATA AGC AAT CCC	

2.1.9 Gebrauchsfertige Systeme

Die gebrauchsfertigen Systeme wurden nach Herstellerangaben verwendet. Das RNeasy-, und das DNeasy-Kit wurden bei RT gelagert. Die mit * gekennzeichneten Produkte wurden bei +4°C, alle anderen bei -20°C gelagert.

Produkt	Hersteller
RNeasy Mini Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
DNeasy Blood & Tissue Kit (250)	Qiagen, Hilden, D
SYBR® GREEN PCR Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Ready Mix Taq PCR Reaction Mix with MgCl ₂	Sigma, München, D
Vectastatin ABC Kit Peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame,

USA *

Vectastatin ABC Kit Peroxidase Goat IgG

Vector Laboratories, Burlingame,

USA *

Vectastatin ABC Kit Peroxidase Guinea Pig IgG

Vector Laboratories, Burlingame,

USA *

2.1.10 Sterilisation von Materialien

Alle Medien, die in einem sterilen Zustand verwendet werden müssen, wurden entweder mit einer Porengröße von 0,2µm steril filtriert, oder im Autoklaven bei 120°C für 20 Minuten inaktiviert. Glas- und Plastikmaterialien wurden ebenfalls autoklaviert. Die Präparationsinstrumente zur Pankreasentnahme wurden mit Hilfe von Ethanol gereinigt und im Autoklav sterilisiert.

2.1.11 Software

Programm	Hersteller
Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
SPSS Statistics 15.0 for Windows	SPSS, Chicago, USA
Word 2010	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde im Lebensalter von 4 Wochen zunächst die Schwanzspitze in einer Länge, die 5 mm nicht überschreitet, mit einer Schere abgesetzt. Hieraus wurde die DNA extrahiert. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die DNA amplifiziert, anschließend gelelektrophoretisch getrennt und schließlich mit Hilfe von UV- Licht sichtbar gemacht.

2.2.1.1. DNA-Extraktion aus einer Mäuseschwanzbiopsie

Die DNA-Extraktion aus den Schwanzbiopsien der Mäuse erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit von Qiagen. Zunächst wurde das Gewebe durch Zugabe von 180µl ATL-Puffer und 20µl Proteinase-K und Inkubation im Heizblock bei 56°C über Nacht lysiert. Am

darauf folgenden Tag folgte die Zugabe von 200µl AL-Puffer und das Vortexen der Proben. Nach der Zugabe von 200µl 70%igem Ethanol und erneutem Vortexen wurde die Lösung auf die Zentrifugationssäule eines Spin Column aufgetragen und für 1 Min. mit 8000 rpm zentrifugiert. Die DNA blieb auf der Membran der Spin Column haften, der Durchlauf wurde verworfen und die Zentrifugationssäule in ein neues 2,0 ml Sammeltube gestellt. Zum Auswaschen von anderen Bestandteilen aus der Membran wurden zunächst 500µl AW1 Puffer und danach 500µl AW2 Puffer auf die Membran gegeben, die Proben wurden mit jeweils 8000 rpm bzw. 12000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zum Auswaschen der DNA wurden 200µl des auf 56°C erwärmten AE Puffers auf die Spin Column pipettiert und bei RT inkubiert. Nach Zentrifugieren über 1 Min. bei 8000 rpm konnte das DNA-haltige Eluat in einem 1,5 ml Tube aufgefangen werden. Das Eluat wurde entweder sofort verarbeitet oder bei -20°C gelagert.

2.2.1.2 Standard-PCR

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde die spezifische DNA amplifiziert, um die Genotypisierung durchzuführen. Mithilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist es möglich, spezifische DNA durch das Enzym DNA-Polymerase zu vervielfältigen.

Die künstliche Polymerasekettenreaktion wurde 1985 von Kary Mullis erfunden. Seine Absicht war es, ein neuartiges DNA-Syntheseverfahren zu entwickeln um mit Hilfe der DNA-Polymerase die DNA durch wiederholte Duplikation in mehreren Zyklen künstlich zu vervielfältigen. Der PCR-Prozess besteht aus einer variablen Anzahl von 12–50 Zyklen, die in einem Thermocycler durchgeführt werden. Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten, die im Folgenden erläutert werden sollen.

1. Strangtrennung (Denaturierung): Die doppelsträngige DNA wird auf 94–96 °C erhitzt, um die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufzubrechen. Dieser Schritt führt zur Denaturierung der DNA.
2. Anlagerung der beiden Primer (Annealing): Nun wird die Temperatur gesenkt, damit sich der Primer optimal an die Zielsequenz des DNA-

Einzelstrangs anlagern kann (Annealing). Die optimale Temperatur ist abhängig von der Nukleotidsequenz und muss für beide Primer aufeinander abgestimmt werden. Die Annealing-Temperatur liegt zwischen 50-72 °C.

3. DNA-Synthese (Elongation): Anschließend wird die Lösung auf 72°C erhitzt, die optimale Temperatur für Taq-DNA-Polymerase. Die Synthese der DNA erfolgt so lange, bis das Ende der Matrize erreicht wird, oder bis die Temperatur im anschließenden Zyklus wieder auf die Denaturierungstemperatur angehoben wird. Die Elongation dauert etwa 30 Sekunden je 500 Basenpaare, variiert aber in Abhängigkeit von der verwendeten DNA-Polymerase.

Nach Abschluss aller Zyklen kühlt der Thermocycler die Reaktionsansätze auf 4-8°C um alle Reaktionen zu stoppen. Hierdurch ist auch die Lagerung für mehrere Stunden möglich, bevor der Ansatz weiterverarbeitet, oder bei -20°C gelagert werden kann.

2.2.1.3 Durchführung der PCR

Zur Durchführung der PCR wurden 2 µl Maus-DNA, 10 µl Ready-Mix, jeweils 1 µl Forward-Primer und Reverse-Primer und 6 µl destilliertes Wasser in 0.2 ml Tubes pipettiert. Als Negativkontrolle dienten destilliertes Wasser und Wildtyp-DNA. Als Positivkontrolle diente die DNA der transgenen Pdx-1-Cre, LSL-Kras^{G12D/+}, LSL-Tpr53^{R172H/+} Mäusen. Die Reaktionsansätze wurden im Thermocycler mit dem jeweils optimalen Programm zur PCR bearbeitet.

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95°C	3,0 Min.
	94°C	0,5 Min.
	60°C	1,0 Min.
	72°C	0,5 Min.
1x	72°C	3,0 Min.

Tab.4 PCR – Programm für P53

Zyklen	Temperatur	Dauer
35x	95°C	3,0 Min.
	94°C	1,0 Min.
	60°C	2,0 Min.

	72°C	1,0 Min.
1x	72°C	3,0 Min.

Tab.5 PCR – Programm für K-ras

Zyklen	Temperatur	Dauer
	95°C	4,0 Min.
35x	95°C	0,5 Min.
	59°C	0,5 Min.
	72°C	0,5 Min.
1x	72°C	5,0 Min.

Tab.6 PCR – Programm für Cre

Substanz	Menge
Ready Mix (Taq PCR Reaction Mix)	10 µl
dH ₂ O	6 µl
Forward – Primer (20pmol/µl)	1 µl
Reverse – Primer (20pmol/µl)	1 µl
genomische DNA	2 µl

Tab.7 PCR – Reaktionsansatz pro Probe



Abb.11: Thermocycler.

2.2.1.4 Herstellung eines Agarosegels

Zur Herstellung eines Agarosegels wurden 3,4 g Agarose und 170ml eines 10x verdünnten TBE-Puffers gemischt und in der Mikrowelle gekocht, bis eine homogene blasenfreie Flüssigkeit entstand. Anschließend wurden 15 µl Ethidiumbromid hinzupipettiert. Zur gleichmäßigen Verteilung wurde das Gefäß langsam geschwenkt. Das Gel wurde langsam und gleichmäßig in eine

Gelkammer gegossen, um Lufteinschlüsse zu verhindern. Nach 30 min. konnte das erkaltete und fest gewordene Gel aus der Kammer entfernt werden. Das Gel wurde in eine Laufkammer gelegt und muss vollständig mit TBE- Puffer bedeckt sein.

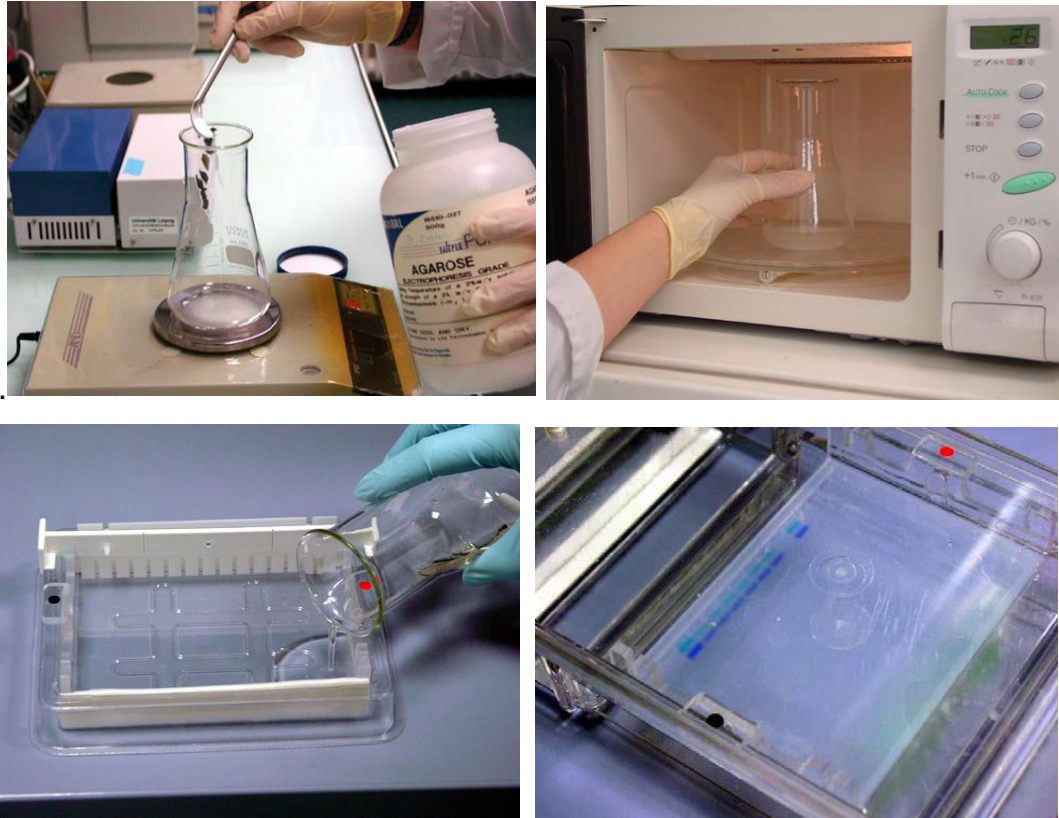


Abb.12: Herstellung eines Agarosegels.

2.2.1.5 Agarosegelelektrophorese und Auswertung der PCR

Zur Trennung und Analyse der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und durch Einlagerung von Ethidiumbromid unter UV- Licht sichtbar gemacht [1]. Durch Anlegen einer Spannung von 120V für 45 Min. erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Zur Dokumentation wurden die Banden durch eine über dem Transilluminator befindliche Kamera fotografiert. Mit Hilfe des Längenmarkers konnte die Größe der Banden kontrolliert werden.

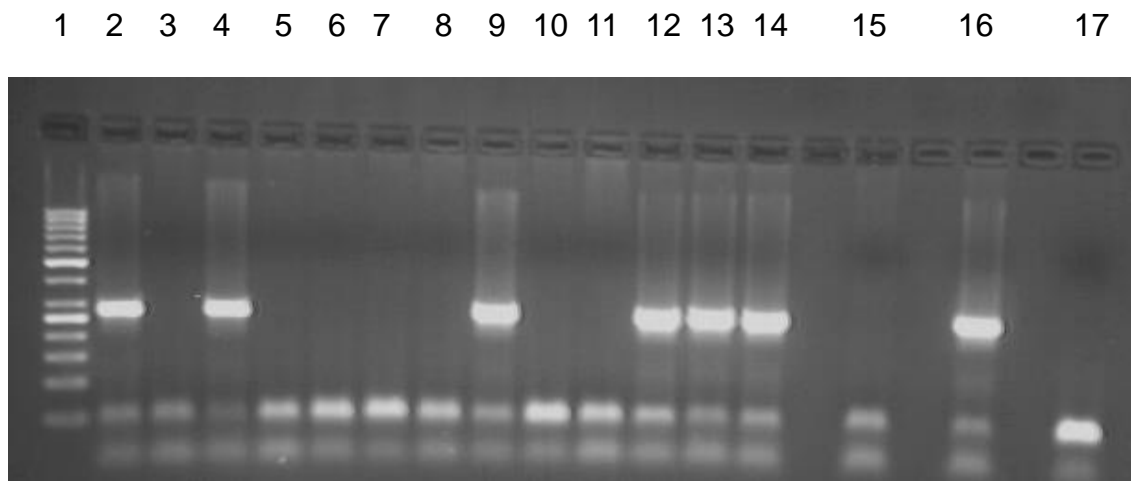


Abb.13: Beispiel eines analysierten Agarosegels (1 = Marker, 2-14 zu analysierende Proben (3, 5-8, 10-11 = negativ, 2, 4, 9, 12-14= positiv), 15 = Wt, 16= PK, 17 = H₂O .)

2.2.2 Haltung und Zucht der Tiere

Heterozygote LSL-Kras^{G12D/+}-Mäuse wurden mit heterozygoten LSL-Tpr53^{R172H/+}-Mäuse gekreuzt, wobei zu erwarten ist, dass ca. 25% der Nachkommen doppelt transgen sind. Die transgenen LSL-Kras^{G12D/+} - LSL-Tpr53^{R172H/+}-Mäuse wurden dann mit den Pdx-1-Cre-Mäusen gekreuzt. Hier ist zu erwarten, dass ungefähr jedes achte Tier alle drei genetischen Merkmale besitzt. Die Mäuse werden in speziellen Käfigen im Tierstall des Biomedizinischen Forschungszentrums der Philipps Universität Marburg bei einer Temperatur von 21 (±1)°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 (±5)% unter sterilen Bedingungen und einem periodischen Tag-Nacht-Rhythmus in zwölfstündigen Intervallen gehalten. Die Fütterung erfolgte mit Standardzuchtfutter und Wasser (pH 7,0) ad libitum. In jedem Zuchtkäfig wurden je ein transgenes Männchen und 2 transgene Weibchen zusammen gehalten. Ab 3 Wochen nach der Geburt wurden die Jungtiere dem Geschlecht nach auf neue Käfige verteilt, sowie mit einem Ohrclip mit fortlaufenden Nummern markiert. Zur Genotypisierung der Mäuse wurde ab der 4. Lebenswoche ein max. 5mm langes Stück Schwanz abgeschnitten. Die nicht oder nur teilweise transgenen Mäuse werden durch eine Überdosis CO₂ in der Atemluft getötet. Die dreifach transgenen Mäuse wurden randomisiert und in

Gruppen von 15 Tieren eingeteilt, die als Kontroll-, oder Behandlungsgruppen dienten.

2.2.3 Versuchsplan und Ablauf der intraperitonealen Injektionen

Aufgrund der antitumoralen Eigenschaften von ASS sollte eine chemotherapeutische Wirkung beim Pankreaskarzinom am Pdx-1-Cre- LSL-Kras^{G12D/+} - LSL-Tpr53^{R172H/+} Mausmodell untersucht werden. Mahmoud et al. hatte nachgewiesen, dass ASS (20mg/kg/täglich) die Formation von Darmtumoren um 44% reduziert [60]. Sclabas et al. zeigten auch, dass ASS (200mg/kg/täglich) das Wachstum des Pankreaskarzinoms reduziert [81]. Die ASS-Dosierung wurde mit 40mg/kg/dreimal wöchentlich gewählt. Die Gemcitabinedosis wurde mit 100mg/kg/Woche festgelegt. Mit Beginn des 3. Lebensmonats wurde die Behandlung der transgenen Tiere mit Gemcitabine oder Aspirin und Gemcitabine begonnen. Die intraperitoneale Injektion der Tiere erfolgte 1 mal bzw. 3 mal pro Woche. Vor jeder Injektion wurde der Injektionsberich desinfiziert. Die Applikation erfolgte unter sterilen Bedingungen mit einem maximalen Volumen von 0.25 ml. Die Applikation erfolgte für jedes Individuum bis zum Tod. Jede Versuchsgruppe von 15 Mäusen wurde bis zum Todeszeitpunkt behandelt und einer Kontrollgruppe von 15 Mäusen gegenüber gestellt.

2.2.4 Tötungszeitpunkte der Gruppen und Entnahme der Organe

Da die Fragestellung dieser Arbeit das Überleben der behandelten Tiere bei einem nicht-präventiven Ansatz untersuchen sollte, wurde bei allen Versuchstieren ab dem 3. Lebensmonat mit der Therapie begonnen. Die Behandlung erfolgte bis zum Tod der Tiere. Hingorani et. al beschreiben, dass es bei den transgenen Mäusen im Verlauf der Erkrankung zur Entwicklung von Aszites kommt, welcher analog zum Menschen am geblähten und aufgetriebenen Abdomen erkennbar ist. Fiel während der Therapie Aszites bei den Versuchstieren auf, so wurden diese innerhalb von 2-3 Tagen durch zervikale Dislokation getötet. Nach dem Eintritt des Todes wurden die äußerlichen Auffälligkeiten der Mäuse festgehalten. Vor dem Öffnen des Abdomens wurden die Mäuse fotografiert. Danach wurde das Abdomen in der

Mittellinie mit einer Schere geöffnet, das Pankreas sicher dargestellt und fotografiert. Anschließend wurde das Pankreasgewebe, sowie alle makroskopisch tumorbefallenen Organe, entnommen. Für die weitere Verarbeitung wurde das Pankreas geteilt, wobei eine Hälfte für die Einbettung in Paraffin, die andere für die RNA-Extraktion bestimmt wurde.

2.2.5 Histologische Untersuchung des Gewebes

Das Gewebe wurde nach standardisierter Methode in Paraffinblöcke eingebettet. Es wurden mindestens zehn 4µm dicke Serienschnittpräparate pro Maus angefertigt. Um den Effekt der Chemotherapie bewerten zu können, ist die korrekte histologische Beurteilung des entnommenen Pankreasgewebes von Bedeutung. Es wurden vor allem der Befall durch invasive Pankreaskarzinome und auftretende Metastasen erfasst, sowie die Expression von molekularen Markern in der immunhistochemischen Färbung beobachtet.

2.2.6 Färbungen

2.2.6.1 Hämalaun-Eosin-Färbung von Paraffinschnitten

Die Objektträger mit dem paraffinierten Gewebe wurden 2 mal in Xylol für jeweils 5 min. entparaffiniert und danach in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 85%, 70%, 50%, 30% und 2 mal ddH₂O) für jeweils 2 min. rehydriert. Die Objektträger wurden mit Hämalaun nach Mayer für 5 min. gefärbt und im fließenden, lauwarmen Wasser für 10 min. gebläut. Danach wurden die Objektträger für 30 sek. mit 0,5%-igem Eosin gegengefärbt und 2 mal für 5 min. in ddH₂O gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 30%, 50%, 70%, 85% und 100% Ethanol für jeweils 2 min. und im Anschluss 2 mal für 5 min. in Xylol dehydriert. Zum Abschluss wurden die Präparate in Histokitt eingedeckelt.

2.2.6.2. Immunhistochemische Färbungen

Als Immunhistochemische Färbung wird eine Methode bezeichnet, mit deren Hilfe Proteine durch Antikörperbindung sichtbar gemacht werden. Spezifische

Antikörper binden an Ihre Antigenstruktur und können ihrerseits durch sekundäre Antikörperkomplexe gebunden werden. Durch die immunhistologische Färbung lässt sich z.B. die Gewebsexpression und die Zellkompartimentlokalisation mikroskopisch bestimmen. Beispielsweise können Transkriptionsfaktoren die im Zellkern lokalisiert sind nur im Zellkern angefärbt werden, membranständige Proteine nur in Teilen der Zellmembran. In der Histopathologie dient die Immunhistochemie in der Regel der Identifikation und Klassifizierung von Tumorzellen die, bestimmte Antigene exprimierend, auf diese Weise bei morphologisch gleicher Erscheinung unterschieden werden können.

2.2.6.2.1 Indirekte Methode

Die indirekte immunhistochemische Färbung funktioniert durch die Applikation eines primären Antikörpers, welcher an das spezifische Antigen in der Probe bindet. In dieser Arbeit wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper und ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex zur Färbung verwendet, welcher den eigentlichen Farbstoff bindet. Hierdurch wird eine verstärkte Färbung erreicht [47]. Die Zielstrukturen färben sich mit dieser Methode braun an. Schließlich wird mit Hämatoxilin gegengefärbt.

2.2.6.2.2 Prozess der immunhistochemischen Färbung

Zur immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Complex-Methode (ABC-Methode) nach Hsu wurden die Objektträger mit dem paraffinierten Gewebe 2 mal für jeweils 5 min. in Xylol entparaffiniert und 2 mal für 2 min in einer absteigenden Ethanolreihe (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50% und 30%) und in ddH₂O rehydriert. Danach wurden die Objektträger zur Demaskierung in Citratpuffer (pH 6.0) für 10 min. unter dem Siedepunkt in der Mikrowelle erhitzt und für 20 min. auf Eis abgekühlt. Die Objektträger wurden 3 mal für jeweils 5 min. in dH₂O gespült. Die Deaktivierung der endogenen Peroxidase des Gewebes erfolgte durch Inkubation der Objektträger in 3 %-igem Wasserstoffperoxid (H₂O₂) für 10 min. bei Raumtemperatur. Das Präparat auf dem Objektträger wurde mit einem spezifischen Stift markiert, der eine Flüssigkeitsbarriere erzeugt, und in eine feuchte Kammer umgesetzt. Durch die

Spülung mit PBST wurde die Oberflächenspannung auf den Objektträgern reduziert. Danach wurden die Objektträger in 10%igem BSA für 60 min. inkubiert. Nach mehrmaligen Spülungen wurde der primäre Antikörper in der optimalen Konzentration aufgetragen, um über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Am darauffolgenden Tag wurden die Objektträger 3 mal für jeweils 5 min. mit PBST gespült, um den primären Antikörper zu entfernen. Danach wurde der sekundäre Antikörper auf den Objektträger aufgetragen und für 60 min. inkubiert. Der sekundäre Antikörper wurde danach wieder entfernt und nach erneutem 3 maligen Spülen im nächsten Schritt das angefertigte ABC-Kit auf den Objektträgern aufgetragen und für 60 min. inkubiert. Nachdem das ABC-Kit entfernt wurde, wurden die Objektträger 3 mal für 5 min. mit PBST gespült. Unter dem Mikroskop wurden die Objektträger mit DAB-Chromogen bis zur optimalen Braunfärbung inkubiert und zum Stoppen der Reaktion mit ddH₂O abgespült. Die Präparate wurden mit Hämalaun für 15 Sek. gegengefärbt und unter fließendem, lauwarmen Wasser für 10 min. gebläut und noch 2 mal für 5 min. in ddH₂O gespült, um den überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Danach wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%) für jeweils 2 min. und 2 mal für 5 min. in Xylol dehydriert. Zum Schluss wurden die Präparate mit Histokitt eingedeckelt.

2.2.7 Statistik

Die Erfassung invasiv wachsender Pankreaskarzinome und der auftretenden Metastasen erfolgte anhand der beim Menschen üblicher Klassifikationen [40]. Nach Auswertung und Durchsicht aller Pankreata der Kontroll-, und Behandlungsgruppen wurden die Daten mit den Programmen Microsoft Excel (Version 2010) und SPSS (Version 15.0) dargestellt. Die Signifikanztestung zwischen den einzelnen Versuchsgruppen wurde mit dem t-Test durchgeführt. Die graphische Auswertung der Überlebenskurven basiert auf der Methode nach Kaplan- Meier.

Die Signifikanzniveaus wurden wie folgt festgelegt:

Nicht signifikant entspricht $p > 0,05$; signifikant entspricht $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1.1 Auswirkung der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mutationen auf das Pankreas

Die zunächst von Lox-Stop-Lox (LSL)-Elementen flankierten LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+} Mutationen werden durch das Kreuzen mit Mäusen, die die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des Pdx1-Promoters exprimieren, pankreasspezifisch aktiviert, indem das LSL-Element ausgeschnitten wird [69]. Die Ergebnisse zeigten, dass alle transgenen Pdx-1-Cre-LSL-Kras^{G12D/+}-LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse unabhängig von ihrer medikamentösen Therapie zum Zeitpunkt des Todes invasive Pankreaskarzinome entwickelt hatten, die den humanen Pankreaskarzinomen entsprechen.

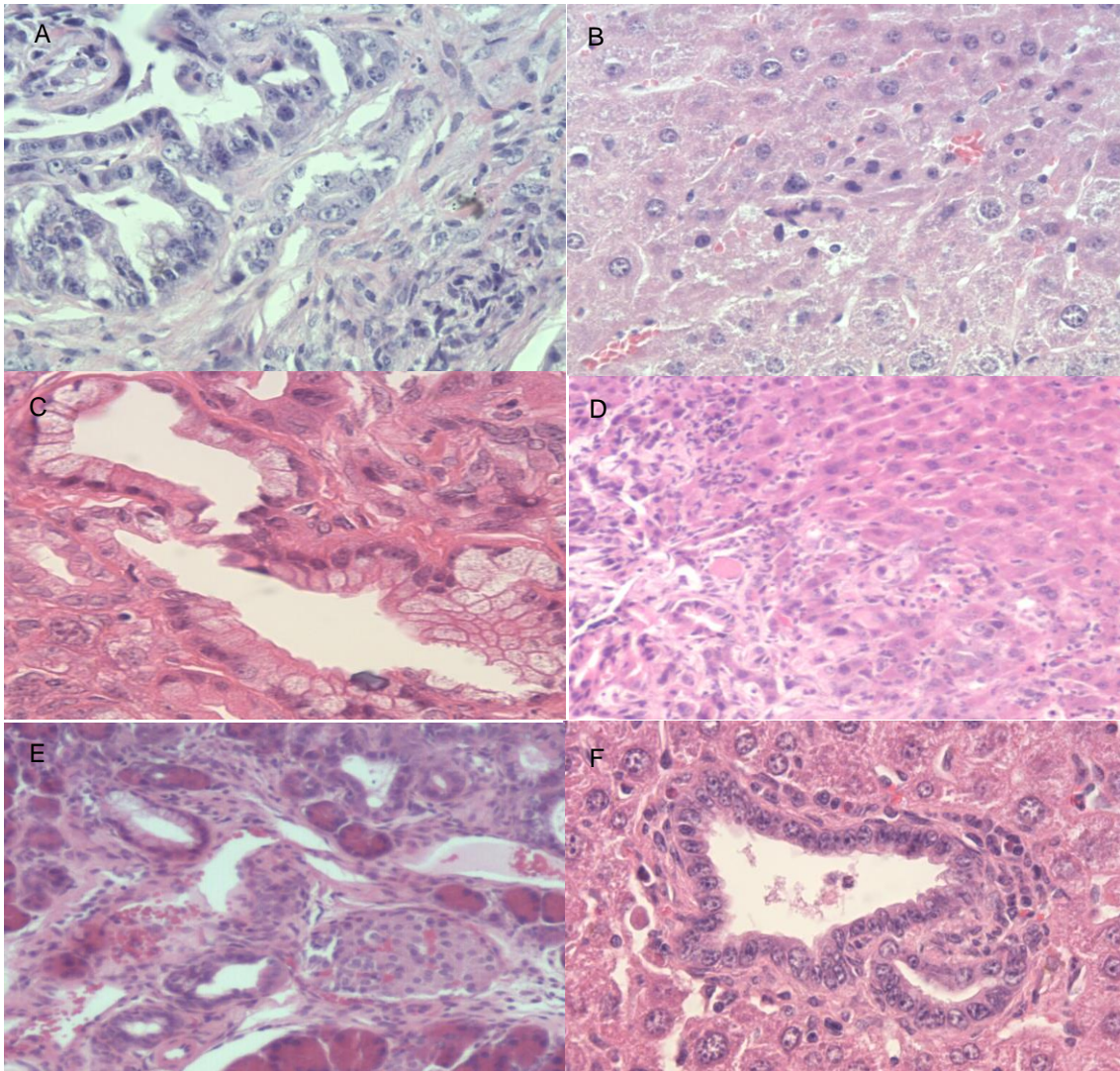


Abb. 14: HE-Färbung von Pankreaskarzinom (A) und Lebermetastasen (B) in der Kontrollgruppe, bei Gemcitabinetherapie (C,D) und bei additiver ASS-Applikation (E,F) bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen.

3.1.2 Auswertung von Drop-outs in den Therapiegruppen

Im Verlauf der Chemotherapie kam es in beiden Therapiegruppen zu Todesfällen während oder kurz nach der Durchführung der intraperitonealen Injektionen. In der mit Gemcitabine behandelten Gruppe verstarben so 2 von 15 behandelten Tieren. In der mit Gemcitabine und ASS behandelten Gruppe verstarben auf diese Weise 4 von 15 Tieren. Da es sich um eine Überlebensstudie handelt konnte nicht bei allen Tieren nach dem Tod Pankreasgewebe asserviert werden. In der Gemcitabinegruppe verstarben 6 von 15 Mäusen, ohne dass eine Pankreasentnahme möglich war. In der Gemcitabine + ASS Gruppe konnte bei 7 von 15 Mäusen kein Gewebe

asserviert werden. In der Kontrollgruppe war eine Gewebeentnahme in 9 von 15 Fällen nicht möglich.

Die Auswertung der im Verlauf der intraperitonealen Injektionen verstorbenen Tiere erfolgte nach dem Intention-to-treat-Prinzip gemäß ihrer Gruppenzugehörigkeit.

3.2 Effekt der Gemcitabine und Gemcitabine + ASS Therapie auf das Überleben der Pdx-1-Cre-LSL-KrasG12D/+LSL-Trp53R172H/+Mäuse

Bei allen Versuchstieren, bei denen nach dem Tod eine Gewebeentnahme möglich war, konnte ein invasives Pankreaskarzinom nachgewiesen werden und wurde als Todesursache angenommen. Somit konnte eine kurative Therapie in keinem der Fälle erreicht werden. Die Kontrolltiere überlebten im Median 159 Tage. Im Vergleich hierzu betrug das mediane Überleben der mit Gemcitabine behandelten Tiere 190 Tage. Mit additiver ASS-Therapie erreichten die Tiere ein medianes Überleben von 200 Tagen. Die durch additive ASS-Gabe erreichte Überlebensverlängerung von 10 Tagen im Vergleich zur alleinigen Gemcitabinetherapie erwies sich als statistisch nicht signifikant ($p=0.096$).

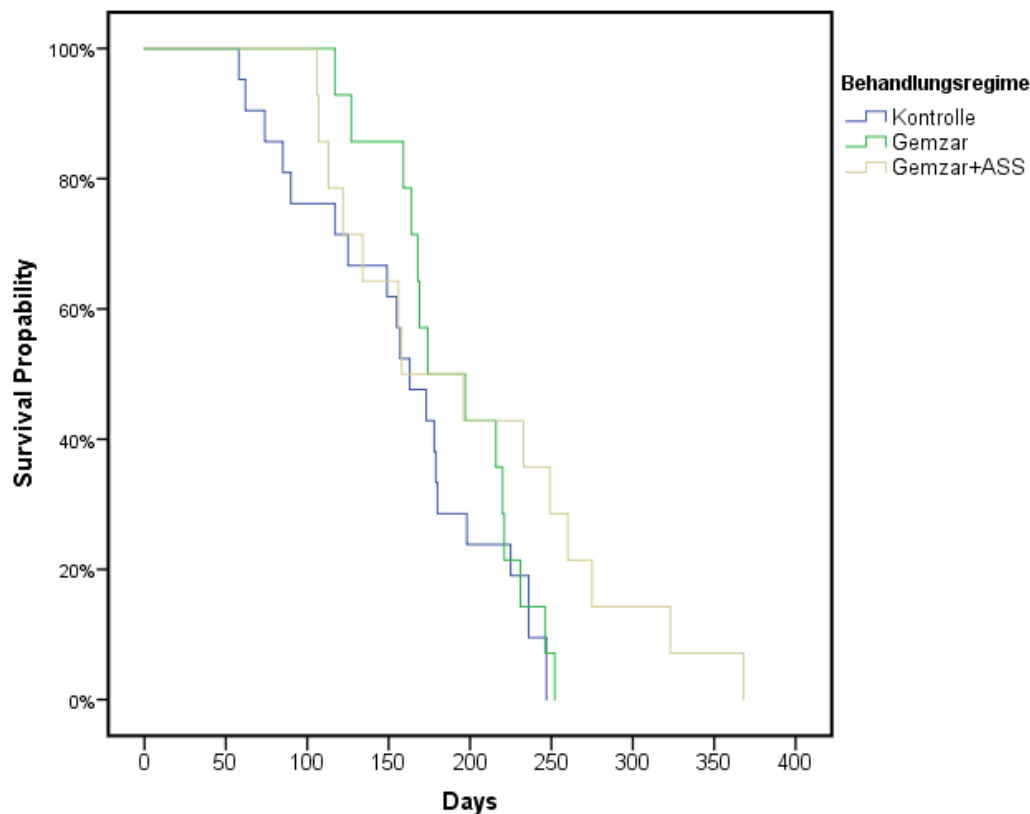


Abb. 15: Kaplan-Meier-Kurve des Gesamtüberlebens in Tagen.

3.3.1 Überexpression von NF- κ B in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

NF- κ B spielt eine entscheidende Rolle in der Aktivierung antiapoptotischer und inflammatorischer Signalwege und reguliert die Regression von vielen Genen, die beim Zellwachstum, der Zellproliferation, der Apoptose und der Tumorangio-genese eine wichtige Rolle spielen. In einer Studie zeigte sich eine erhöhte Aktivität von NF- κ B in verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien und in resezierten Pankreaskarzinomen [9,10]. Es wurde die Expression von NF- κ B in den Pankreaskarzinomen der Versuchsgruppen evaluiert. Das Ergebnis zeigte, dass im normalen Pankreasgewebe aller Gruppen keine Expression von NF- κ B auftrat. Im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe wurde die Überexpression von NF- κ B in PanINs, Pankreaskarzinomen und Metastasen in allen Gruppen nachgewiesen. Die Ergebnisse weisen daraufhin, dass eine Beeinflussung der NF- κ B-Expression durch ASS in einem therapeutischen Ansatz nicht mehr in dem Maß möglich ist, wie es z.B. im präventiven Ansatz gezeigt werden konnte [27].

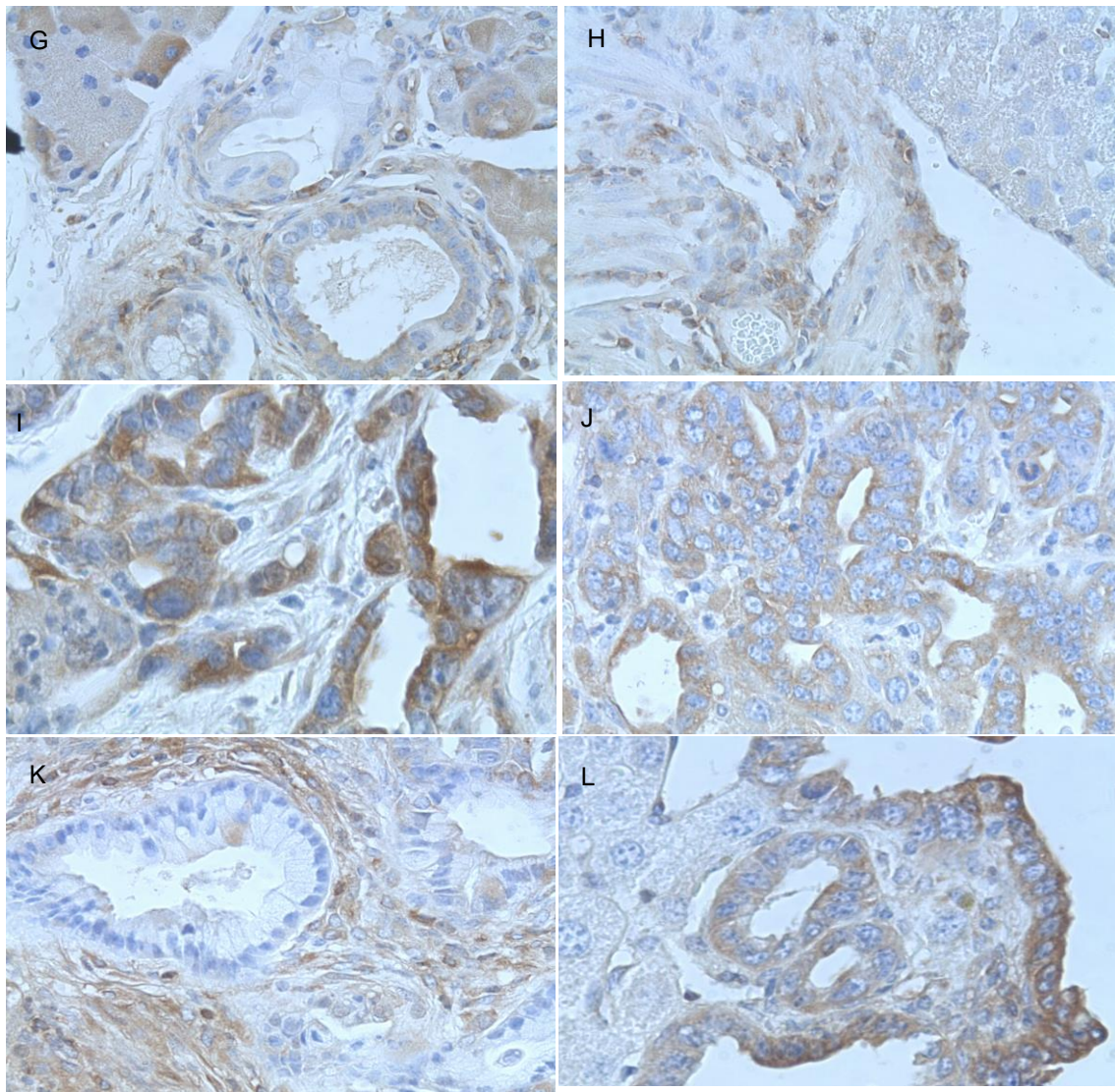


Abb. 16: NF- κ B Expression in Pankreaskarzinom (G) und Lebermetastasen (H) in der Kontrollgruppe, bei Gemcitabinetherapie (I,J) und bei additiver ASS-Applikation (K,L) bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen.

3.3.2 Überexpression der Amylase in PanINs und Pankreaskarzinom in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

Die Amylase wird im gesunden Pankreasgewebe von den Azinuszellen gebildet und ist hier auch immunhistochemisch nachweisbar. Eine Studie zeigte, dass bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+}-Mäusen die Amylase auch in PanINs nachweisbar ist, was zum einen die exokrine Differenzierung zeigt, zum anderen für eine Metaplasie der Gangepithelzellen spricht [72]. Deswegen wurde die Amylase in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

immunhistochemisch untersucht. In den Zellen von PanINs, invasiven Pankreaskarzinomen und Metastasen konnte eine Expression von Amylase gezeigt werden. Hierdurch kann die exokrine Differenzierung der Zellen bestätigt werden. Die drei Versuchsgruppen wiesen keinerlei Unterschiede im Expressionsmuster für Amylase auf.

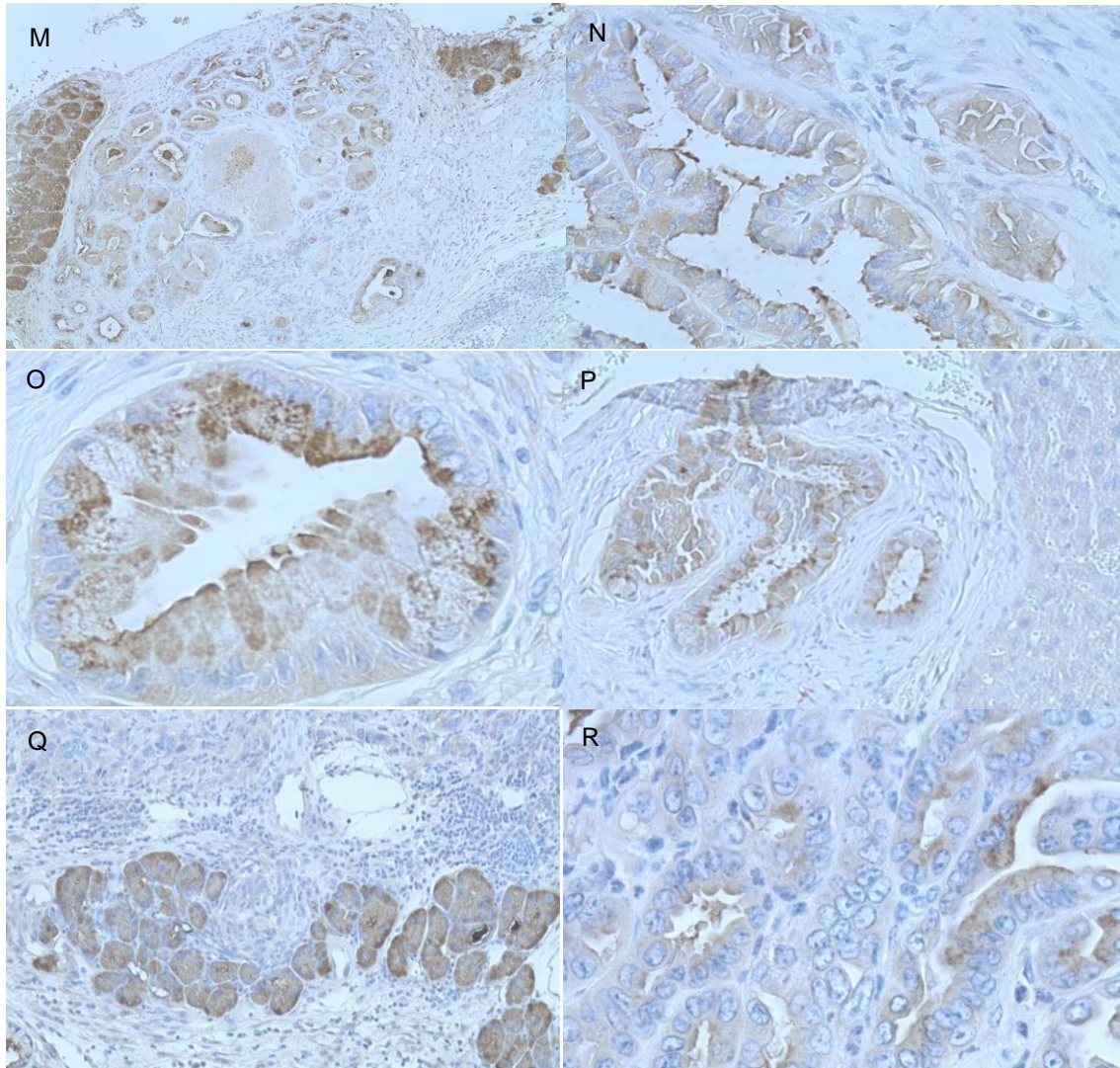


Abb. 17: Amylase Expression in Pankreaskarzinom (M) und Lebermetastasen (N) in der Kontrollgruppe, bei Gemcitabinetherapie (O,P) und bei additiver ASS-Applikation (Q,R) bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen.

3.3.3 Überexpression von Snail in PanINs und Pankreaskarzinom in Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen

In vielen Fällen scheinen Migration und invasives Wachstum vom Tumorzellen erst durch die Ausbildung eines mesenchymalen Phänotyps ermöglicht zu

werden. Hierzu durchlaufen Tumorzellen zumeist zwei Umwandlungen, zunächst die Epitheliale-Mesenchymale-Transformation (EMT), gefolgt von der Mesenchymal-Epithelialen Transformation (MET), da Metastasen in der Regel wieder den epithelialen Charakter des Primärtumors besitzen. In den Tumorzellen kommt es bei der EMT zu einer Reduktion der Expression epithelialer Proteine (z.B. E-Cadherin) und der Induktion mesenchymaler Proteine wie Vimentin oder smooth muscle actin (SMA). Während das Zytokin TGF- β in frühen Tumorstadien meist antiproliferativ und tumorsupprimierend wirkt, fördert es in etablierten Tumoren die EMT. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein Snail die Expression von E-Cadherin reguliert und die EMT in vielen Tumorzellen induziert [11,17]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das Zytokin TGF- β und der Östrogen-Rezeptor die Transkription von Snail regulieren [30,68]. Im Vergleich zu normalem Pankreasgewebe wurde die Überexpression von Snail im metaplastischen Gewebe, PanINs, und Pankreaskarzinom von Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen nachgewiesen (Abb. 18), allerdings konnte kein Anhalt für eine Beeinflussung durch die additive ASS-Gabe gefunden werden.

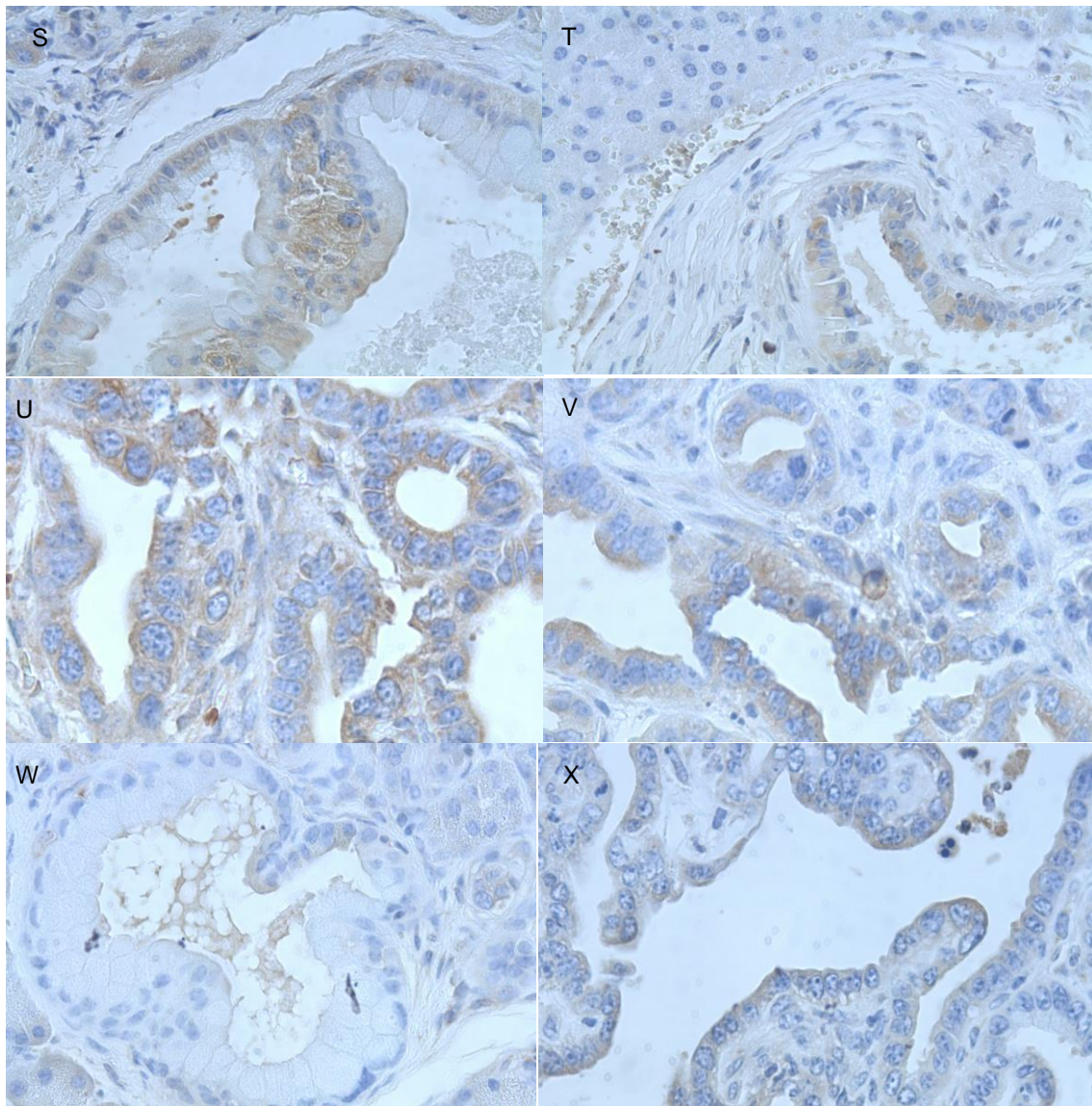


Abb. 18: Snail Expression in Pankreaskarzinom (S) und Lebermetastasen (T) in der Kontrollgruppe und bei Gemcitabinetherapie (U,V) und bei additiver ASS-Applikation (W,X) bei Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäusen.

4. Diskussion

In Deutschland sterben jährlich über 12000 Menschen am Pankreaskarzinom. Insbesondere die fehlenden Frühsymptome und das hieraus resultierende Fehlen von Früherkennungsmethoden, sowie die u.a. mit dem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium zusammenhängenden schlechten Therapiemöglichkeiten machen das Pankreaskarzinom zu einem der malignen Tumore mit der schlechtesten Prognose [2,64]. Weniger als 5% der Patienten überleben die ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung. Die Entstehung des Pankreaskarzinoms aus epithelialen Neoplasien der Pankreasgänge (PanIN) im Sinne einer Adenom-Karzinom-Sequenz, ähnlich des Kolorektalkarzinoms, gilt als gesichert. Es ist davon auszugehen, dass vor allem K-ras und p53-Mutationen für die Karzinogenese verantwortlich sind, wobei K-ras insbesondere in den Anfangsstadien, p53 hauptsächlich in weiter fortgeschrittenen Phasen entscheidende Rollen spielen [69]. Die zu Beginn dieser Arbeit als am wirkungsstärksten angesehene Chemotherapie mit Gemcitabine erreicht ebenfalls nur mäßige Überlebensvorteile. Auch neue Substanzen, wie der EGFR-Inhibitor Erlotinib, bieten einen zwar signifikanten, aber kleinen Überlebensvorteil, der mit starken Nebenwirkungen und hohen Kosten verbunden ist [15,62].

Die Überexpression der COX-2 konnte in Pankreaskarzinomen wiederholt nachgewiesen werden, ebenso das erfolgreiche Herunterregulieren der COX-2 durch deren Suppressoren, z. B. ASS.

In vorangegangenen Arbeiten konnte am Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mausmodell, welches die Karzinogenese des menschlichen Pankreaskarzinoms vergleichsweise realitätsgetreu nachbildet, aussichtsreiche Effekte von ASS als unselektiver COX-Hemmer auf die Entstehung des Pankreaskarzinoms gezeigt werden. In dieser Präventionsstudie war ASS in der Lage die Progression des Pankreaskarzinoms und dessen Vorläuferläsionen zu verlangsamen und partiell zu verhindern [27].

Da die Prävention des Pankreaskarzinoms aber nur für eine kleine Patientengruppe, beispielsweise Patienten mit familiärer Belastung sinnvoll ist, ist die für den Großteil der Patienten angesichts fehlender Früherkennungsmethoden die Therapieverbesserung von entscheidender

Bedeutung. Nach den erfolgversprechenden Ergebnissen der Präventionsstudie war es daher interessant, ASS in einem therapeutischen Ansatz zu testen.

Leider konnten die Ergebnisse der Therapie nicht in dem erhofften Maße erreicht werden. ASS ist bei manchen Tieren in der Lage gewesen das Überleben zusätzlich zur Gemcitabinetherapie zu verlängern. Es bewirkt ein um 5% verlängertes Gesamtüberleben, bezogen auf die Überlebensverlängerung durch Gemcitabine, und verlängert das Überleben im Vergleich zur Kontrollgruppe um 25% . Die Ergebnisse erweisen sich jedoch als statistisch nicht signifikant.

Die Vermutung ASS sei in der Lage über die Hemmung von COX-2 eine Verminderung der NF-κB-Aktivität und somit eine Hemmung des MAPK-Signalwegs zu erreichen durch die das Überleben der Pdx-1-Cre;LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+}-Mäuse verlängert wird, konnte nicht bestätigt werden. Die Effekte scheinen deutlich weniger ausgeprägt als im prophylaktischen Ansatz. Erklärbar wäre dies zum Beispiel, eine Sensitivität gegenüber ASS vorausgesetzt, durch eine zunehmende Zellselektion mit Resistenzentwicklung gegenüber der COX-2 Hemmung durch ASS. Ebenfalls wäre es möglich, dass bereits zu Beginn der Therapie eine bestimmte Zahl von Tumorzellen in der Lage ist, unabhängig von aktivierter COX-2 oder NF-κB Überexpression zu proliferieren.

Da ASS ebenfalls die Thromboxan-A₂-Synthese in Thrombozyten und damit deren Aggregation hemmt, besteht die Möglichkeit, dass ASS durch Prophylaxe thrombembolischer Ereignisse, die beim Pankreaskarzinom gehäuft vorkommen, zu einer Überlebensverlängerung geführt hat.

Da der Endpunkt der Studie das Gesamtüberleben darstellt und folglich in allen Fällen von einer unkontrollierbaren Tumorpherartion auszugehen ist, zeigen die postmortalen Tumoren weder makroskopisch noch mikroskopisch Unterschiede. Auch in den immunhistochemischen Färbungen konnten keine Unterschiede in der Expression der verschiedenen Markerproteine und Zielstrukturen ausgemacht werden. Die Aussagekraft der immunhistologischen Färbungen ist jedoch gering. Dies ist sicherlich der Wahl des Studienendpunktes geschuldet.

Eine bessere Differenzierung möglicher Effekte auf Gewebeebene wäre durch

eine an festen Zeitpunkten durchgeführten histologischen Untersuchungen am aussagekräftigsten.

Durch das Mausmodell konnte die Therapie mit ASS und Gemcitabine am Pankreaskarzinom erfolgreich simuliert werden. Um diese Ergebnisse auf den Menschen übertragen zu können, bedarf es weiterer Untersuchungen. Insbesondere wäre hier der Therapieversuch mit ASS in einer klinischen Studie zielführend.

Nach aktuellen Ergebnissen scheint eine FOLFIRINOX-Kombinationstherapie aus Folinsäure, 5-FU, Irinotecan und Oxaliplatin eine signifikante Verlängerung des Überlebens gegenüber der Gemcitabine-Monotherapie zu zeigen [22]. Fraglich ist ob ASS auch hier positive Auswirkungen auf das Therapieergebnis hat. Die sehr positiven Ergebnisse aus unserer Prophylaxestudie implizieren, dass eine gemeinsame Additivtherapie mit einem ACE-Hemmer in Erwägung gezogen werden könnte. Sowohl die Kombinationstherapie, als auch die ACE-Inhibitor-Monotherapie hat in der Prävention gute Ergebnisse gezeigt [27].

Trotz der nichtsignifikanten Ergebnisse und in Ermangelung von Alternativen ist die Frage zu stellen, ob ASS eine nebenwirkungsarme und kostengünstige Therapieoption beim Pankreaskarzinom darstellt und in klinischen Studien überprüft werden sollte.

5. Quellenverzeichnis

1. Aaij C, Borst P.: The gel electrophoresis of DNA; *Biochem Biophys Acta*. 1972 May 10;269(2):192-200.
2. Albores-Saavedra J, Vuitich J, Henson DE: Exocrine pancreas. In: Henson DE, Albores-Saavedra J (eds): *Pathology of incipient neoplasia*. Ed. Philadelphia: W B Saunders Co, 1993; 182-190.
3. Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell*. 1988;53(4):549–54
4. Altomare D A, Tanno S, De Rienzo A, et al. Frequent activation of AKT2 kinase in human pancreatic carcinomas. *J Cell Biochem*2003;88:470–6.
5. Anderson KE, Johnson TW, Lazovich D, Folsom AR. Association between nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the incidence of pancreatic cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94:1168–1171.
6. Anderson WF, Umar A, Viner JL, Hawk ET. The role of cyclooxygenase inhibitors in cancer prevention. *Curr Pharm Des* 2002; 8: 1035-1062.
7. Anliker SL, McClure MS, Britton TC, Stephan EA, Maple SR, Cooke GG. Degradation chemistry of gemcitabine hydrochloride, a new antitumor agent.*J Pharm Sci*. 1994 May;83(5):716-9.
8. Apple SK, Hecht JR, Lewin DN et al. (1999) Immunohistochemical evaluation of K-ras,p53, and HER-2/neu expression in hyperplastic, dysplastic, and carcinomatous lesions of the pancreas: evidence for multistep carcinogenesis. *Hum Pathol* 30:123.
9. Asano T, Yao Y, Zhu J, et al. The rapamycin analog CCI-779 is a potent inhibitor of pancreatic cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:295–302.
10. Asano T, Yao Y, Zhu J, Li D, Abbruzzese JL, Reddy SA. The PI 3-kinase/Akt signaling pathway is activated due to aberrant Pten expression and targets transcription factors NF-kappaB and c-Myc in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 2004; 23:8571-8580.
11. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J et al.

(2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2: 84–89.

12. Boring CC, Squires TS, Tong T: Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 1994; 44: 7-26.

13. Bos JL, Verlaan-de Vries M, van der Eb AJ, Janssen JW, Delwel R, Löwenberg B, Colly LP. Mutations in N-ras predominate in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1987 Apr;69(4):1237-41.

14. Boschman CR, Stryker S, Reddy JK, Rao MS (1994) Expression of p53 protein in precursor lesions and adenocarcinoma of human pancreas. *Am J Pathol* 145:1291.

15. Burris HA 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* 1997; 15:2403-13.

16. Campbell PM, Groehler AL, Lee KM, Ouellette MM, Khazak V, et al. (2007) K-RAS promotes growth transformation and invasion of immortalized human pancreatic cells by raf and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Cancer Res* 67: 2098–2106

17. Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG et al. (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2: 76–83.

18. Chan A, Giovannucci E. Primary Prevention of Colorectal Cancer, *Gastroenterology*, Volume 138, Issue 6, May 2010, Pages 2029–2043.e10.

19. Cheng J Q, Ruggeri B, Klein W M, et al. Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3636–41.R.

20. Conroy T, Desseigne F, Ychou M, Bouché O, Guimbaud R, Bécouarn Y, Adenis A, Raoul JL, Gourgou-Bourgade S, de la Fouchardière C, Bennouna J, Bachet JB, Khemissa-Akouz F, Péré-Vergé D, Delbaldo C, Assenat E, Chauffert B, Michel P, Montoto-Grillot C, Ducreux M; Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup: FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med*. 2011 May 12;364(19):1817-25.

21. Cox AD et al. Ras history, Small GTPases 1:1, 2-27; July/August 2010
22. Cully M, You H, Levine AJ, Mak, TW: Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. Nature Reviews Cancer 6, 184-192 (March 2006).
23. Deutsches Ärzteblatt 94, Heft 49, 5. Dezember 1997.
24. Ding XZ, Hennig R, Adrian TE. Lipoxygenase and cyclooxygenase metabolism: new insights in treatment and chemoprevention of pancreatic cancer. Mol. Cancer 2003;2:10.
25. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Upregulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. Gastroenterology 1994;107: 1183-1188.
26. Ermert L, Dierkes C, Ermert M. Immunohistochemical expression of cyclooxygenase isoenzymes and downstream enzymes in human lung tumors Clin Cancer Res 2003; 9: 1604-1610.
27. Fendrich V, Chen NM, Neef M, Waldmann J, Buchholz M, Feldmann G, Slater EP, Maitra A, Bartsch DK. et.al.: The angiotensin-I-converting enzyme inhibitor enalapril and aspirin delay progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and cancer formation in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. Gut. 2010 May;59(5):630-7. Epub 2009 Nov 1.
28. Friess H, Kleef J, Fischer L, Mueller M, Büchler MW. Chirurgische Standardtherapie beim Pankreaskarzinom. Chirurg 2003; 74:183-190.
29. Friess H, Yamanaka Y, Kobrin M S, et al. Enhanced erbB-3 expression in human pancreatic cancer correlates with tumor progression. Clin Cancer Res 1995;1:1413–20.
30. Fujita N, Jaye DL, Kajita M, Geigerman C, Moreno CS, Wade PA. (2003). MTA3, a Mi-2/NuRD complex subunit, regulates an invasive growth pathway in breast cancer. Cell 113: 207–219.
31. Funahashi H, Satake M, Dawson D, Huynh NA, Reber HA, Hines OJ, Eibl G. Delayed progression of pancreatic intraepithelial neoplasia in a conditional Kras(G12D) mouse model by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor. Cancer Res. 2007 Aug 1;67(15):7068-7.
32. Ghaneh P, Costello E, Neoptolemos JP; Biology and management of

pancreatic cancer; Gut 2007;56:1134-1152.

33. Gilmore TD. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006; 25:6680–84.

34. Grewe M, Gansauge F, Schmid R M, et al. Regulation of cell growth and cyclin D1 expression by the constitutively active FRAP-p70s6K pathway in human pancreatic cancer cells; *Cancer Res* 1999;59:3581–7.

35. Habbe N, Shi G, Meguid RA, et al.: Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:18913e8.

36. Heinemann V, Xu YZ, Chubb S, Sen A, Hertel LW, Grindey GB, Plunkett W: Cellular elimination of 2',2'-difluorodeoxycytidine 5'-triphosphate: a mechanism of self-potential. *Cancer Res* 1992; 52:533-539.

37. Hennessy BT, Smith DL, Ram PT, Lu Y, Mills GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery; *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Dec;4(12):988-1004.

38. Hernandez-Aya LF, Gonzalez-Angulo AM. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in breast cancer. *Oncologist*. 2011;16:404–414

39. Hingorani SR, Petricoin EF, Maitra A, Rajapakse V, King C, Jacobetz MA, Ross S, Conrads TP, Veenstra TD, Hitt BA, Kawaguchi Y, Johann D, Liotta LA, Crawford HC, Putt ME, Jacks T, Wright CV, Hruban RH, Lowy AM, Tuveson DA: Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 2003, 4:437-450.

40. Hingorani SR, Wang L, Multani AS, Combs C, Deramaudt TB, Hruban RH, Rustgi AK, Chang S, Tuveson D: Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7: 469-483.

41. Hofmann I, Weiss A, Elain G, Schwaederle M, Sterker D, Romanet V, et al. (2012) K-RAS Mutant Pancreatic Tumors Show Higher Sensitivity to MEK than to PI3K Inhibition In Vivo. *PLoS ONE* 7(8)

42. Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q., Bartsch H, et al. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra *Mutat. Res.*, 431 (1999), pp. 199-203

43. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Compton C, Garrett ES, Goodman SN, Kern SE, Klimstra DS, Kloppel G, Longnecker DS, Luttges J, Offerhaus GJ: Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions. *Am J Surg Pathol* 2001; 25:579-586.
44. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, Furth EE, Furukawa T, Klein A, Klimstra DS, Kloppel G, Lauwers GY, Longnecker DS, Luttges J, Maitra A, Offerhaus GJ, Perez-Gallego L, Redston M, Tuveson DA. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 2006; 66:95-106.
45. Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinomas using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol*. 1993 Aug;143(2):545-54.
46. Hsu SM, Raine L.: Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem*. 1981 Nov;29(11):1349-53.
47. Ito D, Fujimoto K, Mori T, et al. In vivo antitumor effect of the mTOR inhibitor CCI-779 and gemcitabine in xenograft models of human pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2006;118:2337–43.
48. Jacobs EJ, Connell CJ, Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Thun MJ. Aspirin use and pancreatic cancer mortality in a large United States cohort. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96:524–528.
49. Jones S, Zhang X, Parsons DW, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science (New York, NY)*. 2008;321(5897):1801–6.
50. Karreth F, Tuveson DA. Twist induces an epithelial-mesenchymal-transition to facilitate tumor metastasis. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1058-9.
51. Kopp E, Ghosh S: Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956e9.
52. Kort WJ, Hulsman LO, van Schalkwijk WP, Weijma IM, Zondervan PE,

Westbroek DL. Reductive effect of aspirin treatment on primary tumor growth and metastasis of implanted fibrosarcoma in rats. *J Natl Cancer Inst.* 1986; 76:711–720.

53. Khurana V, Caldito G, Barkin JS: Angiotensin converting enzyme inhibitors decrease the incidence of pancreatic cancer: a study of half a million US veterans. *Eur J Cancer* 2008;1: S47e48.

54. Lever AF, Hole DJ, Gillis CR, et al. Do inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme protect against risk of cancer? *Lancet* 1998; 352:179e84.

55. Levine AJ: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 89 _1997. 323–331.

56. Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 637–43.

57. Löhr M, Müller P, Mora J, Brinkmann B, Ostwald C, Farre A, Lluís F, Adam U, Stubbe J, Plath F, Nizze H, Hopt UT, Barten M, Capella G, Liebe S(2001a): p53 and K-ras mutations in pancreatic juice samples from patients with chronic pancreatitis. *Gastrointest Endosc* 53 (7): 734-743.

58. Lu T, Stark GR. Cytokine secretion and constitutive NF- κ B in cancer. *Cell Cycle.* 2004; 3:1114–7.

59. Maitra A, Adsay NV, Argani P, Iacobuzio-Donahue C, De Marzo A, Cameron JL, Yeo CJ, Hruban RH: Multicomponent analysis of the pancreatic adenocarcinoma progression model using a pancreatic intraepithelial neoplasia tissue microarray. *Mod Pathol* 2003; 16:902-910.

60. Mahmoud NN, Dannenberg AJ, Mestre J, Bilinski RT, Churchill MR, Martucci C, Newmark H, Bertagnolli MM. Aspirin prevents tumors in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Surgery* 1998; 124:225-231.

61. Marshall J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer* 2006;107:1207–18.

62. Moore MJ, Goldstein D, Hamm J, Figer A, Hecht JR, Gallinger S, et al. Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 2007; 25:1960-6.

63. Mulder JW¹, Offerhaus GJ, de Feyter EP, Floyd JJ, Kern SE, Vogelstein B, Hamilton SR. The relationship of quantitative nuclear morphology to molecular genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence of the large bowel. *Am J Pathol.* 1992 Oct;141(4):797-804.
64. Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H et al.: A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer. *N Engl J Med* 2004; 350: 1200–1210.
65. O’Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al, and the American College of Emergency Physicians, and the Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association task force on practice guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2013; 61: 485–510.
66. Ohki R., Nemoto J., Murasawa H., Oda E., Inazawa J., Tanaka N., and Taniguchi T. (2000). Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *J. Biol. Chem.* 275, 22627-22630.
67. Patrignani, P, Sciulli, M, Manarini, S, Santini, G, Cerletti, C, Evangelista, V. COX-2 is not involved in thromboxane biosynthesis by activated human platelets. *J Physiol Pharmacol.* 1999;50(4):661–667
68. Peinado H, Quintanilla M, Cano A. (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278: 21113–21123.
69. Pellegata NS, Sessa F, Renault B, Bonato M, Leone BE, Solcia E, Ranzani GN: K-ras and p53 gene mutations in pancreatic cancer: ductal and non-ductal tumors progress through different genetic lesions. *Cancer Res* 1994;54:1556-1560.
70. Polyak, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Kinzler, K.W., Vogelstein, B A model for p53-induced apoptosis *Nature* Volume 389, Issue 6648, 1997, Pages 300-305
71. Rastogi N, Mishra D. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Div.* 2012 Dec 26;7(1):26. doi: 10.1186/1747-1028-7-26.
72. Repasky, G.A., Chenette, E.J. and Der, C.J. (2004) Renewing the

conspiracy theory debate: does Raf function alone to mediate Ras oncogenesis? Trends Cell Biol, 14, 639-647.

73. Ruggeri B A, Huang L, Wood M, et al. Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. Mol Carcinog 1998;21:81–6.

74. Ryan D P, O'Neil B H, Supko J G, et al. A phase I study of bortezomib plus irinotecan in patients with advanced solid tumors. Cancer 2006;107:2688–97.

75. Samuels Y, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers Science, 304 (2004), p. 554

76. Scaltriti M, Baselga J: The Epidermal Growth Factor Receptor Pathway: A model for targeted therapy. Clin Cancer Res 2006;12:5268-5272.

77. Schernhammer ES, Kang JH, Chan AT, et al. A prospective study of aspirin use and the risk of pancreatic cancer in women. J Natl Cancer Inst. 2004;96:22–28.

78. Schlieman M G, Fahy B N, Ramsamooj R, et al.: Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. Br J Cancer 2003;89:2110–5.

79. Schmelzle T, Hall M N.: TOR a central controller of cell growth. Cell 2000;103:253–62.

80. Schneider G, Lersch C, Schmid RM.: Karzinogenese des Pankreaskarzinoms. Chirurg 2003; 74:165-170.

81. Sclabas GM, Uwagawa T, Schmidt C, Hess KR, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ.: Nuclear factor kappa B activation is a potential target for preventing pancreatic carcinoma by aspirin. Cancer 2005; 12:2485-2490.

82. Shah S A, Potter M W, Ricciardi R, et al. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. J Surg Res 2001;97:123–30.

83. Sheehan KM, Sheahan K, O'Donoghue DP, MacSweeney F, Conroy RM, Fitzgerald DJ, Murray FE. The relationship between cyclooxygenase-2 expression and colorectal cancer JAMA 1999; 282: 1254-1257.

84. Sheng H, Shao J, Washington MK, DuBois RN. Prostaglandin E2 increases growth and motility of colorectal carcinoma cells J Biol Chem 2001; 276: 18075-

18081.

85. Siewert, Rothmund, Schumpelick: Praxis der Viszeralchirurgie; Onkologische Chirurgie, 3. Auflage 2010

86. Smith JB, Willis AL. Aspirin selectively inhibits prostaglandin production in human platelets. *Nat New Biol* 1971; 231: 235–37.

87. Song J et al. Cyclooxygenase-2 expression is associated with poor overall survival of patients with gastric cancer: a meta-analysis. *Dig Dis Sci.* 2014 Feb;59(2):436-45

88. Steinberg W et al. The clinical utility of the Ca19-9 tumor-associated-antigen. *Am J Gastroenterology* 1990, 85: 350-355

89. Timofeev O, Schlereth K, Wanzel M, Braun A, Nieswandt B, Pagenstecher A, Rosenwald A, Elsässer HP, Stiewe T: p53 DNA binding cooperativity is essential for apoptosis and tumor suppression in vivo. *Cell Rep.* 2013 May 30;3(5):1512-25.

90. Thun MJ, Henley SJ, Patrono C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94: 252-266.

91. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells *Cell* 1998; 93: 705-716.

92. Tucker ON, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1999;59:987–990.

93. van Haperen VW, Veerman G, Vermorken JB, Pinedo HM, Peters G: Regulation of phosphorylation of deoxycytidine and 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine); effects of cytidine 5'-triphosphate and uridine 5'-triphosphate in relation to chemosensitivity for 2',2'-difluorodeoxycytidine. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:911-918.

94. Vasudevan KM1 AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell.* 2009 Jul 7;16(1):21-32

95. Vivanco, I., Sawyers, C.L The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer *Nature Reviews Cancer* Volume 2, Issue 7, July 2002, 489-501

96. Wiegel T et al.: Strategien in der multimodalen Therapie des resektablen und nicht-resektablen Pankreaskarzinoms, Strahlenther. Onkol 2000, 176: 299-306
97. Wong KK, Engelman JA, Cantley L Targeting the PI3K signaling pathway in cancer Curr Opin Genet Dev. 2010 February ; 20(1): 87
98. Yamanaka Y, Friess H, Kobrin M S, et al. Overexpression of HER2/neu oncogene in human pancreatic carcinoma. Hum Pathol1993;24:1127–34.
99. Yasumaru M, Tsuji S, Tsujii M, et al.: Inhibition of angiotensin II activity enhanced the antitumor effect of cyclooxygenase-2 inhibitors via insulin-like growth factor I receptor pathway. Cancer Res 2003;63:6726e34.
100. Yu HG, Ai YW, Yu LL, Zhou XD, Liu J, Li JH, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway plays an important role in chemoresistance of gastric cancer cells against etoposide and doxorubicin induced cell death. Int J Cancer. 2008;122:433–443.

6. Anhang

6.1 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:

Barth, Bartsch, Czubayko, Daut, Fendrich, Geks, Gress, Hoyer, Klose, Koolman, Kühnert, Lill, Lohoff, Maier, Moll, Mueller, Neubauer, Neumüller, Pagenstecher, Renz, Richter, Ruchholtz, Schulze, Vogelmeier, Wagner, Waldegger, Weihe, Werner, Wilhelm.

6.2 Danksagung

Ich danke dem Team der Klinik für Viszeral-, Thorax-, und Gefäßchirurgie für die hervorragende klinische und wissenschaftliche Ausbildung und Betreuung, insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. Volker Fendrich, der mich immer unterstützt und motiviert hat, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

6.3 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: "Überlebensstudie am transgenen Tumormausmodell des Pankreaskarzinoms bei Chemotherapie mit Gemcitabine und additiver Aspirinapplikation." in der Klinik für Viszeral-, Thorax-, und Gefäßchirurgie unter Leitung von Prof. Dr. med. Volker Fendrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in-, oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Die vorliegende Arbeit wurde in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Plassmeier L, Knoop R, Waldmann J, Kesselring R, Buchholz M, Fichtner-Feigl S, Bartsch DK, Fendrich V. Aspirin prolongs survival and reduces the number of Foxp3+ regulatory T cells in a genetically engineered mouse model of pancreatic cancer. *Langenbecks Arch Surg.* 2013 Oct;398(7):989-96. doi: 10.1007/s00423-013-1105-2. Epub 2013 Aug 30.

Würzburg, den 22.11.2013. Revidiert am 07.03.2015. Revidiert am 20.07.2015
Revidiert am 30.08.2016. Revidiert am 12.08.2018. Angenommen am
25.03.2021